

Zelluläres Thermometer

Tageszeitabhängige Körpertemperaturrhythmen regulieren die Genexpression

MARCO PREUSSNER, FLORIAN HEYD
INSTITUT FÜR RNA-BIOCHEMIE, FU BERLIN

Alternative splicing is a dynamically regulated mechanism that dramatically increases the genomes coding capacity. Alternative splicing is regulated in a time-of-day dependent manner and depends on mammalian body temperature cycles. This observation led to the discovery of a body temperature sensitive kinase, which acts as sensor translating small changes in temperature (~ 1 °C) into altered phosphorylation of RNA-binding proteins, which in turn control over 1.500 splicing events.

DOI: 10.1007/s12268-020-1397-z
© Die Autoren 2020

Die meisten Protein-codierenden humanen Gene sind in codierende Bereiche (Exons) und nicht-codierende Bereiche (Introns) unterteilt. Um eine durchgehend codierende messenger-RNA (mRNA) zu erhalten, müssen daher die Introns entfernt und die Exons miteinander verknüpft werden (Spleißen). Dieser Prozess wird durch das Spleißosom katalysiert – ein makromolekularer Komplex, der schrittweise auf jedem Intron zusammengesetzt wird [1].

Humane Gene besitzen durchschnittlich etwa acht Exons, und durch die alternative Kombination dieser Exons (oder Teilen von Exons) kann ein Gen verschiedene mRNAs

erzeugen. Diesen Prozess nennt man alternatives Spleißen (Abb. 1A). Über 90 Prozent aller humanen Gene werden alternativ gespleißt [2, 3]. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung der Codierungskapazität des Genoms. Interessant ist auch, dass komplexere Organismen wie der Mensch deutlich mehr alternative Spleißisoformen produzieren als niedrigere Organismen, während die Anzahl an Protein-codierenden Genen ähnlich ist [4].

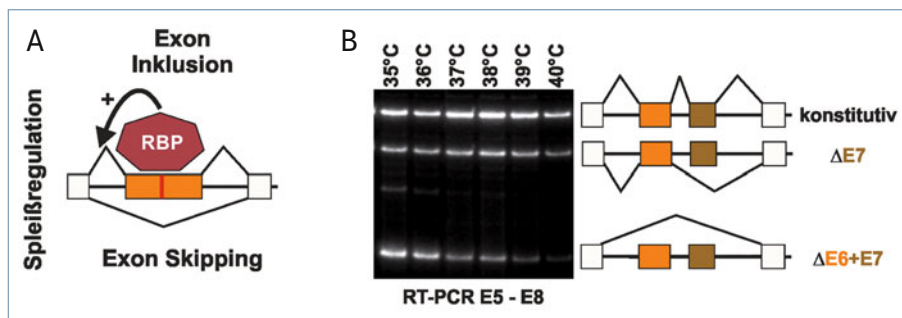
Alternatives Spleißen ist ein dynamischer Prozess. Dabei werden einzelne Isoformen häufig nur in einem bestimmten Zelltyp, Entwicklungsstadium oder infolge eines spezifi-

schens Signals gebildet. Hierzu assoziieren RNA-bindende Proteine mit der unprozessierten Prä-mRNA und regulieren dadurch das Resultat einer alternativen Spleißentscheidung (Abb. 1A). Diese RNA-bindenden Proteine werden dynamisch exprimiert bzw. modifiziert und erlauben so die gleichzeitige Regulation ganzer Netzwerke [5].

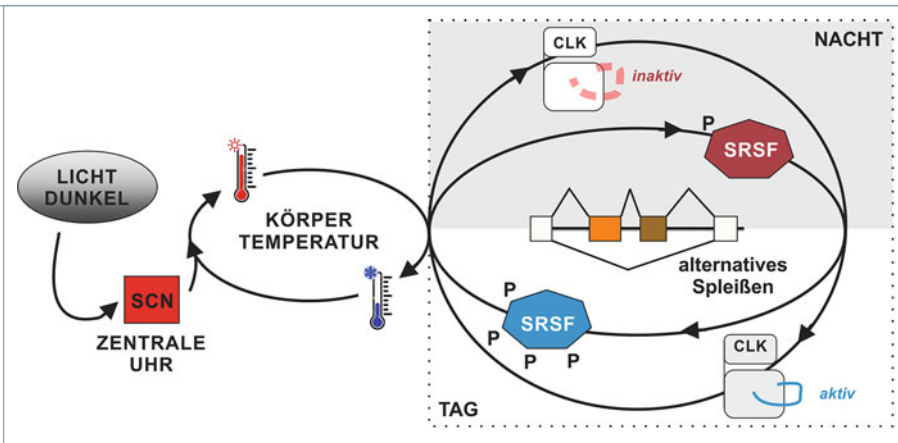
Spleißen und die circadiane Uhr

Unsere Arbeit basiert auf der Entdeckung, dass alternatives Spleißen durch die Tageszeit reguliert ist. Genauer fanden wir eine Spleißisoform im murinen *U2af26*-Gen, die nur tagsüber im Gehirn von Mäusen gebildet wird [6]. Diese Entdeckung führte zu der grundsätzlichen Frage: Wie kann die Änderung der Tageszeit auf zellulärer Ebene wahrgenommen werden und zu verändertem Spleißen führen?

Die Tageszeit wird in den meisten Lebewesen durch circadiane Uhren gemessen – hierbei erzeugt ein Transkriptions-/Translations-*feedback loop* autonome Rhythmen in der Genexpression. Diese innere Uhr ermöglicht die Wahrnehmung der Tageszeit auch in Abwesenheit eines externen Lichtsignals. In Vertebraten fungiert eine Gehirnregion (suprachiasmatischer Nukleus) als oberster Schrittmacher [7]. Der Wechsel von Licht zu Dunkelheit synchronisiert diesen Schrittmacher, welcher daraufhin verschiedene rhythmische Signale erzeugt (z. B. Hormone wie Cortisol oder Melatonin), die zu 24-stündiger rhythmischer Genexpression in fast jeder einzelnen Körperzelle führen. Unsere Experimente zeigten aber, dass diese zelluläre circadiane Uhr für die beobachteten Unterschiede im Spleißen nicht verantwortlich ist. Wir vermuteten daher, dass hierfür eines der rhythmischen systemischen Signale direkt verantwortlich sein könnte. Ein solches Signal ist die Körpertemperatur. Diese liegt nicht konstant bei 37 °C, sondern ist während der Aktivphase höher und während der Ruhephase niedriger. Durch spleißsensitive RT-PCRs mit radioaktiv markierten Primern konnten wir tatsächlich zeigen, dass ein Unterschied von 1 °C ausreicht, um alterna-



▲ Abb. 1: Alternatives Spleißen. **A**, Spleißregulation durch RNA-bindende Proteine (RBP). Konstitutive Exons sind als weiße Boxen, das alternative Exon als orange Box dargestellt. Die Exons sind durch Introns (Linie) verbunden. Beim Spleißen kann das alternative Exon eingebaut (oben) oder ausgelassen (unten) werden. Hier bindet ein RBP an seine Zielsequenz (rot) und bewirkt die Inklusion des Exons. **B**, Radioaktive RT-PCR zeigt temperaturabhängiges Spleißen. Ein Beispiel zeigt, dass die Isoform ohne Exons 6 und 7 ($\Delta E6 + E7$) linear mit der Temperatur korreliert [8].



▲ **Abb. 2:** Wie die Tageszeit alternatives Spleißen reguliert. Helligkeit wird von der zentralen Uhr im Gehirn (suprachiasmatischer Nucleus, SCN) registriert. Dieser erzeugt Körpertemperaturrhythmen, die von CLKs (*CDC2-like kinases*) als dem zellulären Thermometer gemessen werden. In Mäusen resultiert eine höhere Körpertemperatur nachts in inaktiver CLK. SR-Proteine (SRSF, Serin/Arginin(SR)-reiche Spleißfaktoren) werden durch CLKs phosphoryliert (P) und regulieren alternatives Spleißen [8, 11].

tives Spleißen in einer murinen neuronalen Zellkultur zu regulieren (**Abb. 1B**). Außerdem zeigte die bioinformatische Analyse von RNA-Sequenzierdaten aus MEF (*mouse embryo fibroblast*)-Zellen, dass ein globales Netzwerk von Spleißisoformen auf Änderungen der Temperatur reagiert [8, 9].

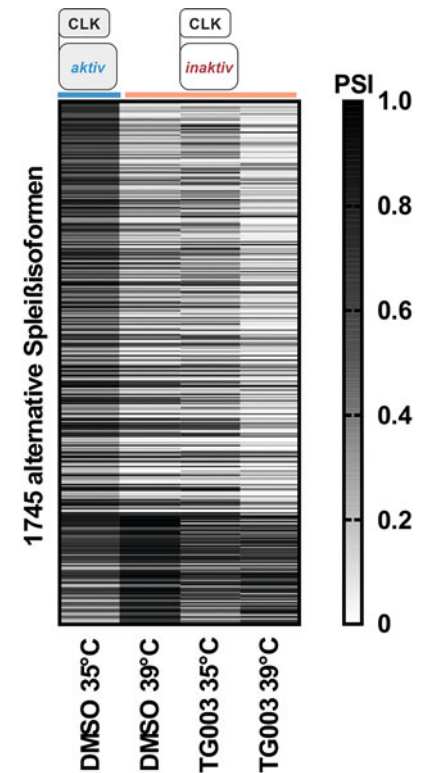
SR-Protein-Phosphorylierung reguliert alternatives Spleißen

Das externe Signal „Licht“ wird also in ein internes Signal „Temperatur“ umgewandelt. Aber wie kann ein Unterschied von ungefähr 1 °C das Spleißen modifizieren? Um dies zu verstehen, haben wir einen einzelnen Spleißvorgang im Detail charakterisiert und dadurch generelle temperatursensitive Faktoren entdeckt. Durch die Mutation von RNA-Bindestellen und durch die Manipulation der Expressionshöhe von RNA-bindenden Proteinen konnten wir zeigen, dass SR-Proteine (Proteine mit einer Serin/Arginin(SR)-rei-

chen Domäne) hierbei eine wichtige Rolle spielen [8, 10]. SR-Proteine sind eine spezielle Gruppe von RNA-bindenden Proteinen. Alle SR-Proteine enthalten eine N-terminale RNA-bindende Domäne und C-terminal zahlreiche SR-Dipeptide. Durch Phosphorylierung der Serine wird die Lokalisation und die Aktivität von SR-Proteinen reguliert. Wir konnten zeigen, dass SR-Proteine bei niedrigeren (Körper)Temperaturen stärker phosphoryliert sind, wodurch es zu verändertem alternativen Spleißen kommt (**Abb. 2**).

CLK1/4 – eine Kinase als Temperatursensor

Die Tageszeit reguliert also über die Körpertemperatur die Phosphorylierung von SR-Proteinen. Als letztes fehlendes Puzzleteil untersuchten wir, wie Änderungen der Temperatur gemessen werden und zu alternativer SR-Protein-Phosphorylierung führen. Zwei Gruppen von Kinasen phosphorylieren



▲ **Abb. 3:** CLK1/4 (*CDC2-like kinases 1/4*) als zelluläres Thermometer. Eine Heatmap zeigt das Spleißmuster von 1.745 Events in humanen HEK293-Zellen. Gezeigt sind nur solche Events, die sich zwischen 35 und 39 °C in der Dimethylsulfoxid(DMSO)-Kontrolle unterscheiden. Die Exon-Inklusion (PSI 1,0; *percent spliced in*) ist in Schwarz gezeigt, *exon skipping* in Weiß (PSI 0,0). Für eine Mehrzahl der veränderten Spleißisoformen ergibt sich bei 35 °C in der DMSO-Kontrolle eine höhere Inklusion als bei 39 °C (durch aktive CLK, oben angedeutet). 39 °C und/oder Inhibition durch TG003 resultieren in inaktiver CLK und *exon skipping* [11].

SR-Proteine und eignen sich damit als Thermosensor: SRPKs (*serine-arginine protein kinases*) und CLKs (*CDC2-like kinases*). Kinase-Assays mit aufgereinigten Proteinen zeig-

Plateforme pour la chimie,
la pharmacie et la biotechnologie

ILMAC
LAUSANNE

7. und 8. Oktober 2020 | Expo Beaulieu Lausanne | ilmac.ch

Für die französischsprachige Schweiz



Teilnahme sichern:
ilmac.ch/anmelden

Partner

VAUD+

BioAlps

science**INDUSTRIES**
SWITZERLAND

Swiss Biotech
Association

SCV Schweizerischer Chemiker-
und Pharmazeutiker-Verband

SCS
Société Chimique
Suisse

SWISSMEM

HEALTH
VALLEY

In Ar Ti S
Fondation InArTiS

ten eindeutig, dass CLKs auf Temperatur reagieren, während SRPKs temperaturunabhängig sind [11]. CLKs sind im engen Bereich der Körpertemperatur (zwischen 36 und 38 °C) stark reguliert und eignen sich damit ideal als zellulärer Sensor der Körpertemperatur. Anders als für viele andere Enzyme beschrieben, sind CLKs bei niedrigeren Temperaturen aktiver, was mit der höheren Phosphorylierung von SR-Proteinen in der inaktiven (kühleren) Phase korreliert. Interessant ist außerdem, dass CLKs von verschiedenen Organismen an die jeweilige Körpertemperatur angepasst sind – CLKs fungieren also als evolutionär adaptiertes Thermometer und könnten damit z. B. auch an dem Phänomen der temperaturinduzierten Geschlechtsentscheidung in Reptilien beteiligt sein.

Durch strukturelle Studien und Simulationen erhielten wir detaillierte Einblicke in den Mechanismus der Temperatursensitivität. Dabei fanden wir, dass nur ein bestimmter Teil der Kinase (das aktivierende Segment) strukturell flexibel ist. Dieser Teil nimmt nur bei Kälte eine geordnete – und damit katalytisch aktive – Konformation ein. Ein Austausch dieses Segments zwischen der temperatursensitiven CLK und der temperaturunabhängigen SRPK reichte dabei aus, um Temperatursensitivität zu stören oder zu erzeugen. Tatsächlich reduzierte die Mutation eines einzelnen Histidins im aktivierenden Segment die Temperatursensitivität deutlich. Bei höheren Temperaturen orientiert sich das Histidin in Richtung der Substrat-bindenden Stelle, und diese Konformation könnte für die Inaktivierung der Kinase bei Hitze verantwortlich sein. Interessant ist außerdem, dass die Temperatursensitivität von CLK-Homologen aus Reptilien und Fliegen an die jeweilige Lebenstemperatur angepasst sind. Das aktivierende Segment ist allerdings hochkonserviert; wir vermuten daher, dass andere Bereiche der Kinase den genauen Bereich der Temperatursensitivität festlegen.

Um zu zeigen, dass CLKs auch als Thermometer in lebenden Zellen fungieren, untersuchten wir globale Spleißmuster in humanen Krebszellen mittels RNA-Sequenzierung. Dabei wurde die kalteinduzierte Aktivität zweier nah verwandter Kinasen, CLK1 und CLK4, durch einen pharmakologischen Inhibitor (TG003; blockiert die ATP-Bindestelle [12]) geblockt. Die Analyse der Spleißmuster zeigte ein eindeutiges Ergebnis (**Abb. 3**): Während in Kontrollzellen die Temperatur einen starken Einfluss auf über 1.500 Exons

hat, ist dieser Effekt nach der Inhibition von CLK1/4 stark reduziert. Außerdem sind die Spleißmuster in Kontrollzellen bei 39 °C fast identisch mit dem Spleißmuster von inhibierten Zellen bei 35 °C. Hohe Temperatur hat also eindeutig einen inhibierenden Effekt auf CLK1/4 *in vivo*. Zusammen zeigen diese Ergebnisse einen neuen Signalweg der rhythmischen Genexpression (**Abb. 2**).

Ausblick

Die RNA-Sequenzierung von humanen und murinen Zellen ergab Hunderte Spleißisoformen in unterschiedlichsten Genen, die durch Temperatur reguliert sind. In einem nächsten Schritt versuchen wir zu verstehen, welchen Einfluss diese Isoformen auf die Funktion der jeweiligen Gene hat. Darüber hinaus untersuchen wir, wie Temperatur globale Netzwerke verändert – und welche Rolle dies bei humanen Krankheiten spielen könnte. Denn unsere Körpertemperatur ist nicht nur durch die Tageszeit reguliert. Auch Krankheiten können die Körpertemperatur verändern (z. B. Fieber); es gibt aber auch Tumoren, die lokal eine erhöhte Temperatur haben. Zudem zeigt die Entdeckung einer temperatursensitiven Kinase, dass auch in gleichwarmen Lebewesen wie dem Menschen, mit nur sehr kleinen Körpertemperaturänderungen, die Temperatur durchaus eine zentrale Rolle spielt – diese reguliert vermutlich deutlich mehr, als wir im Moment wissen.

Danksagung

M. Preußner bedankt sich für ein Stipendium der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung. Unsere Arbeit zur circadianen Uhr ist finanziert durch die DFG (HE5398/4-1, HE5398/4-2).

Literatur

- [1] Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701–718
- [2] Pan Q, Shai O, Lee LJ et al. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40:1413–1415
- [3] Wang ET, Sandberg R, Luo S et al. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470–476
- [4] Chen L, Bush SJ, Tovar-Corona JM et al. (2014) Correcting for differential transcript coverage reveals a strong relationship between alternative splicing and organism complexity. *Mol Biol Evol* 31:1402–1413
- [5] Ule J, Blencowe BJ (2019) Alternative splicing regulatory networks: functions, mechanisms, and evolution. *Mol Cell* 76:329–345
- [6] Preussner M, Wilhelmi I, Schultz AS et al. (2014) Rhythmic *U2af26* alternative splicing controls PERIOD1 stability and the circadian clock in mice. *Mol Cell* 54:651–662
- [7] Albrecht U (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74:246–260
- [8] Preussner M, Goldammer G, Neumann A et al. (2017) Body temperature cycles control rhythmic alternative splicing in mammals. *Mol Cell* 67:433–446.e4
- [9] Preussner M, Heyd F (2018) Temperature-controlled rhythmic gene expression in endothermic mammals: all diurnal rhythms are equal, but some are circadian. *Bioessays* 40:e1700216
- [10] Goldammer G, Neumann A, Strauch M et al. (2018) Characterization of *cis*-acting elements that control oscillating alternative splicing. *RNA Biol* 15:1081–1092
- [11] Haltenhof T, Kotte A, De Bortoli F et al. (2020) A conserved kinase-based body temperature sensor globally controls alternative splicing and gene expression. *Mol Cell* 78:57–69
- [12] Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T et al. (2004) Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem* 279:24246–24254

Funding: Open Access funding provided 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. Florian Heyd
Dr. Marco Preußner
Abteilung RNA-Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 6
D-14195 Berlin
mpreussner@zedat.fu-berlin.de
florian.heyd@fu-berlin.de

AUTOREN



Marco Preußner

2002–2007 Biologiestudium an der Universität Gießen. 2007–2011 Promotion in der Biochemie bei Prof. Dr. A. Bindereif, Gießen. 2012–2013 Postdoc im Labor von Prof. Dr. F. Heyd am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Universität Marburg und seit 2013 an der FU Berlin.



Florian Heyd

1997–2002 Biochemiestudium an der FU Berlin und der Universität Cambridge, UK. 2003–2008 Promotion und Postdoc in Zellbiologie bei Prof. Dr. T. Möröy, Essen und Montreal, Kanada. 2008–2011 Postdoc im Labor von Prof. Dr. K. Lynch, UTSW, Dallas, und später University of Pennsylvania, USA. 2011 Emmy-Noether-Stipendium, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Universität Marburg. Seit 2013 Professor für RNA-Biochemie an der FU Berlin.