

## RNA-Synthese

# RNA-Polymerase I: einer spezialisierten Transkriptionsmaschine auf der Spur

MICHAEL PILSL<sup>1</sup>, HERBERT TSCHOCHNER<sup>2</sup>, JOACHIM GRIESENBECK<sup>2</sup> UND CHRISTOPH ENGEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>STRUCTURAL BIOCHEMISTRY GROUP, REGENSBURG CENTER FOR BIOCHEMISTRY, UNIVERSITÄT REGENSBURG

<sup>2</sup>LEHRSTUHL BIOCHEMIE III, REGENSBURG CENTER FOR BIOCHEMISTRY, UNIVERSITÄT REGENSBURG

**In eukaryotes three major nuclear RNA Polymerases (Pols I, II and III) transcribe the genome. Pols II and III transcribe many different genes. Pol I has only one target from which it synthesizes the precursor for 3 of 4 ribosomal (r)RNAs accounting for up to 60 percent of total cellular RNA. Dedication of Pol I and its specific transcription factors to transcribe a single gene underlines the importance of rRNA synthesis. Research in Regensburg aims at understanding mechanism(s) of Pol I transcription.**

DOI: 10.1007/s12268-022-1809-3  
© Die Autoren 2022

■ Seit mehr als 20 Jahren versuchen Arbeitsgruppen der Universität Regensburg, die sich jetzt im *Regensburg Center of Biochemistry* (RCB) zusammengeschlossen haben, die basale RNA-Polymerase(Pol)-I-Transkriptionsmaschinerie der Bäckerhefe molekular zu charakterisieren. Eine wachsende Hefezelle kann bis zu 30 Ribosomen pro Sekunde produzieren, welche zu einem großen Teil aus RNA bestehen, die von Pol I synthetisiert wird [1]. Pol I baut demnach bis zu 200.000 Nukleotiden in ribosomale RNA pro Sekunde ein. Diese enorme Syntheseleistung lässt sich durch die äußerst effiziente Transkriptionsinitiation und -elongation von Pol I sowie den Umstand erklären, dass rRNA-Gene in eukaryotischen Genomen in repetitiven Genclustern vorkommen (**Abb. 1A**). So können viele rRNA-Gene gleichzeitig abgeschrieben werden. Ein Ziel der Regensburger Arbeitsgruppen ist es, die Mechanismen der rRNA-Gentranskription durch Pol I zu verstehen. Um das zu erreichen, soll der Prozess der rRNA-Synthese durch Pol I in genau definierten Systemen biochemisch funktionell und strukturell „im Reagenzglas“, *in vitro*, rekonstituiert werden. Diese Ergebnisse vergleichen wir dann mit zellbiologischen

Befunden in lebenden Hefezellen, *in vivo*. Während der *in vitro*-Ansatz genau definierte Systeme nutzen kann, enthält er wahrscheinlich nicht den vollständigen Satz an allen *in vivo* beteiligten Faktoren. Im Gegensatz hierzu ist eine große Limitation der *in vivo*-Analysen, die das vollständige System beschreiben, dass man direkte und indirekte Effekte auf die rRNA-Synthese häufig nicht unterscheiden kann. Somit ergänzen und stärken sich beide Ansätze und erschließen das gesamte Potenzial des aktuell verfügbaren Methodenspektrums der Biochemie.

### Der biochemische Baukasten: Analyse der Pol-I-Transkription *in vitro*

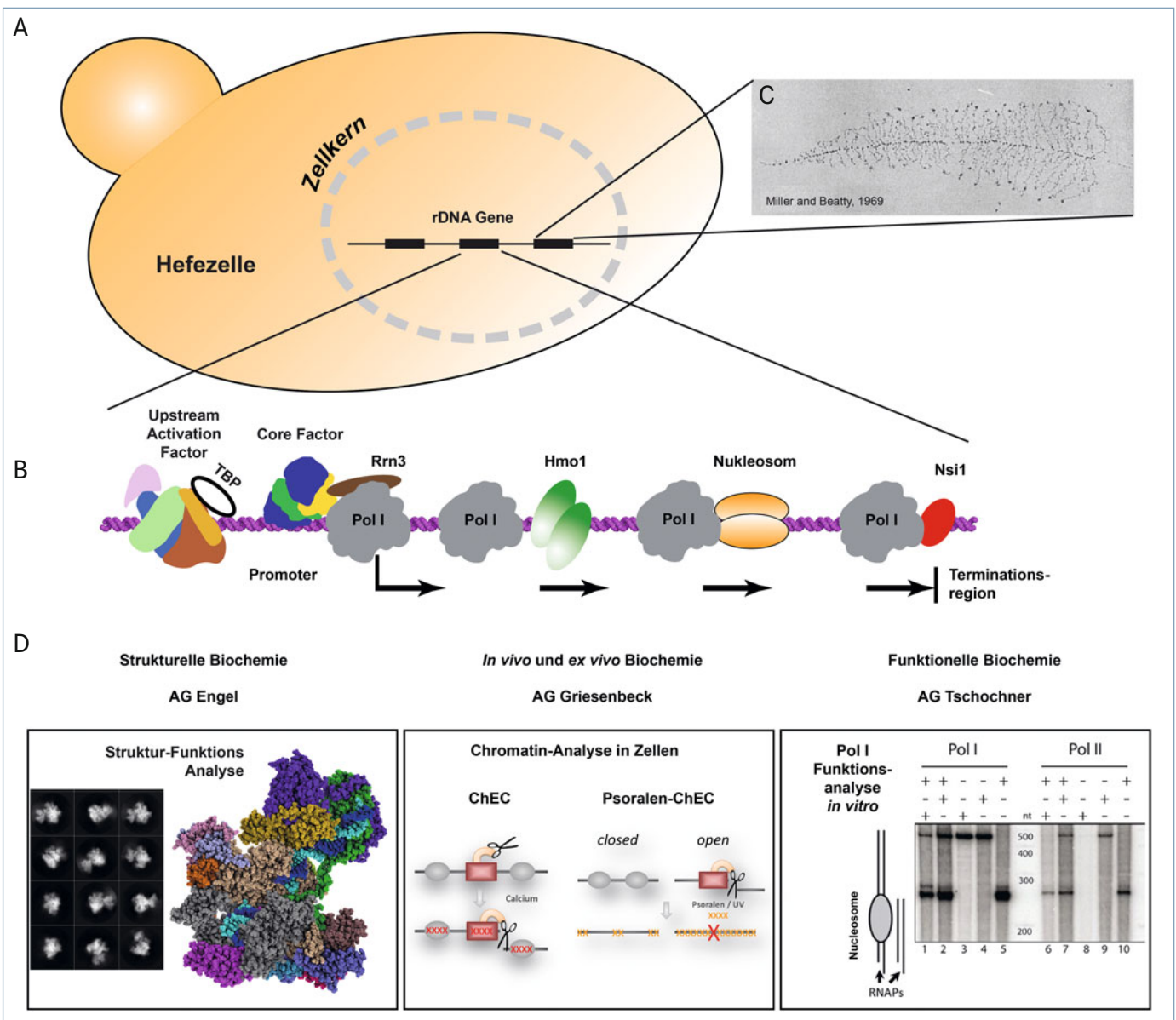
Der biochemische Ansatz versucht, die komplexen Mechanismen von *in vivo*-Prozessen in isolierten Systemen nachzuvollziehen. Hierzu wurden in den Anfängen die interessierenden Faktoren in langwierigen Reinigungsschritten aus den Ursprungsorganismen isoliert [2]. Heutzutage wird nur noch das Pol-I-Enzym (welches aus 14 Untereinheiten besteht) aus Hefe isoliert, während die beteiligten Transkriptionsfaktoren in heterologen Systemen rekombinant exprimiert und

gereinigt werden können. In definierten *in vitro*-Transkriptionsansätzen kann eine basale spezifische Transkriptionsinitiation der Pol I zusammen mit nur zwei aufgereinigten Faktoren erreicht werden. Bei diesen Faktoren handelt es sich um den aus drei Proteinuntereinheiten bestehenden *core factor* (CF) und dem Initiationsfaktor Rrn3 (**Abb. 1B**). In Anwesenheit eines weiteren Multiproteinkomplex, dem *upstream activation factor* (UAF), der aus den Histonen H3 und H4 sowie vier hefespezifischen Proteinen besteht, und durch Zugabe des TATA-bindenden Proteins (TBP) kann die Effizienz der RNA-Synthese durch Pol I *in vitro* stark gesteigert werden. Während Rrn3, CF und UAF hochspezifisch für das Pol-I-System sind, wird TBP auch von Pol II und Pol III verwendet [3].

Die Rekonstitution der Pol-I-Initiationsaktivität ermöglicht es, die spezifischen Aufgaben der einzelnen Komponenten an der stromaufwärts von dem transkribierten Bereich liegenden Kontrollregion, dem Promotor, zu charakterisieren. In funktionellen Experimenten kann z. B. geklärt werden, in welcher Abfolge die Faktoren an den Promotor rekrutiert werden, wie der Gesamtkomplex stabilisiert wird, wie die Promotorstruktur geöffnet und die Elongation initiiert wird. Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zu dem Modell, dass UAF und TBP am Promotor zuerst CF und schließlich den Pol-I-Rrn3-Komplex rekrutieren [2]. Der Pol-I-Rrn3-Komplex kann dann die Synthese der rRNA beginnen. Geht Pol I im Anschluss in eine produktive Elongationsphase über, verlässt Rrn3 den Komplex, um wieder für weitere Initiationsvorgänge zur Verfügung zu stehen. Die Pol-I-Transkription wird dann am Ende des rRNA-Gens wahrscheinlich durch das DNA-bindende Protein Nsi1 terminiert [4].

### Caught in the act – Visualisierung der Pol-I-Transkription auf molekularer Ebene

Mit dem nun verfügbaren Baukasten an Transkriptionsfaktoren und dem aufgerei-



**▲ Abb. 1:** Untersuchungen der Transkription der ribosomalen (r)RNA-Gene durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol I) in dem eukaryotischen Modellorganismus Hefe. **A,** In allen Eukaryoten (hier Bäckerhefe) synthetisiert Pol I die rRNA von Multikopienloci (r)DNA. **B,** In Hefe wird die Initiation der rRNA-Transkription durch die Promotor-gebundenen Faktoren *upstream activation factor* (UAF), TATA-bindendes Protein (TBP) und *core factor* (CF) reguliert, die zur Rekrutierung des initiationskompetenten Rrn3-Pol-I-Komplexes führen. Rrn3 dissoziiert von Pol I in den frühen Phasen der Elongation, in denen Nucleosomen im Gen durch die Transkription depletiert werden und das Protein Hmo1 mit den abgelesenen rRNA-Genen assoziiert und wahrscheinlich die Pol-I-Elongation unterstützt. Die Termination der Pol-I-Transkription erfordert den DNA-gebundenen Faktor Nsi1. **C,** Von Pol I transkribierte rRNA-Gene wurden schon im Jahr 1969 unter dem EM visualisiert. Die beobachteten Strukturen werden auch als *christmas trees* bezeichnet. Bis zu hundert transkribierende Pol-I-Moleküle bilden den „Christbaumstamm“, von Pol I neu transkribierte rRNAs bilden die „Äste“ und Proteine, die mit den 5'-Enden der rRNA assoziieren, bilden die „Christbaumkugeln“ (entnommen aus Miller OL, JR, Beatty BR (1969) Portrait of a gene. *J Cell Physiol* 74 (Suppl 1): 225–232). **D,** In Regensburg werden die Pol-I-Transkription und rRNA-Gen-Chromatinstruktur funktionell und strukturell untersucht.

nigten Pol-I-Enzym wird auch eine strukturelle Untersuchung möglich. Die lange dominierende Technik der Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen erlaubte die Bestimmung der atomaren Struktur der Pol I mit allen ihren Untereinheiten [5]. In den vergangenen Jahren hat eine technische „Revolution“ auf dem Gebiet der Kryoelektronenmikroskopie (EM) es ermöglicht,

Schnappschüsse von Strukturen verschiedener Multiproteinkomplexe in unterschiedlichen funktionellen Stadien zu bestimmen [6]. Mit diesen Strukturen kann man nun die komplexen Abläufe verstehen und mit anderen Transkriptionssystemen vergleichen. Inspiriert von solchen Schnappschüssen wurde gezeigt, dass Pol I in einem inaktiven dimeren Zustand vorliegen kann [5] und

durch Komplexbildung mit Rrn3 in einer monomeren, initiationskompetenten Form stabilisiert wird [7, 8]. Der Pol-I-Rrn3-Komplex kann dann mit CF einen minimalen Präinitiationskomplex (PIC) am rRNA-Genpromotor bilden [9]. Dieser PIC geht nach erfolgreichem Transkriptionsstart in einen initial transkribierenden Komplex und schließlich in einen produktiv elongierenden

Komplex über [10]. Der Vergleich all dieser Zwischenzustände und deren funktionelle Beschreibung zeigten, welche strukturellen Dynamiken des Pol-I-Enzyms und seiner Transkriptionsfaktoren für die Funktion und Regulation wichtig sind [11], und wie sich diese von anderen Transkriptionssystemen unterscheiden. Mit diesen Anpassungen wird Pol I den spezifischen Anforderungen der rRNA-Synthese gerecht. Trotz enormer Fortschritte ist der Prozess der Pol-I-Transkription noch immer nicht vollständig dokumentiert. Erst kürzlich wurde die Struktur von UAF im Komplex mit TBP am rRNA-Genpromotor gelöst [12]. Interessanterweise bindet TBP – anders als im Pol-II- und Pol-III-System – im Komplex mit UAF nicht an die DNA, was die Frage aufwirft, wie ein vollständiger PIC aus UAF, TBP, CF und Pol I-Rrn3 aussehen wird.

### rRNA-Genchromatin – die natürliche Matrize der Pol-I-Transkription

Im Zellkern liegt das Genom in Form eines Nukleoproteinkomplexes vor, dem Chromatin. Hauptkomponenten des Chromatins sind Histonproteine, welche zusammen mit DNA die Nukleosomen bilden [13]. Durch die starken Wechselwirkungen zwischen Histonen und DNA ist die DNA-Matrize für die meisten nukleären Prozesse unzugänglich. Deswegen ist es eine Herausforderung für die kernständigen RNA-Polymerasen, die Transkription der DNA-Matrize in Gegenwart von Nukleosomen zu bewerkstelligen. Rekonstitutionsversuche der Transkription zeigten, dass gereinigte Pol I und Pol III – im Gegensatz zu Pol II – *in vitro* hergestellte nukleosomale Matrizen effizient transkribieren konnten [14]. Details über die Mechanismen, die diesem Phänomen zugrunde liegen, fehlen allerdings bislang. Interessanterweise deuten Untersuchungen an, dass Pol I *in vivo* Nukleosomen-freie rRNA-Gene abschreibt, mit denen das Protein Hmo1 assoziiert [13]. Im inaktiven Zustand sind rRNA-Gene, wie auch der große Rest des Genoms, in Nukleosomen verpackt.

Wie Pol I es schafft, rRNA-Gene von Nukleosomen „zu befreien“, ist weitgehend unverstanden [13]. Da es unklar ist, inwieweit *in vitro* rekonstituierte nukleosomale Matrizen natürliches Chromatin reflektieren, haben wir eine Technik entwickelt, die es möglich macht, natives rRNA-Genchromatin aus der Hefezelle in ausreichenden Mengen zu reinigen [15]. Mithilfe dieser Matrizen sollte es in Zukunft möglich sein, weitere

wichtige Einblicke zu gewinnen, wie die Pol-I-Transkriptionsmaschinerie natives Chromatin transkribiert.

### Und wie sieht es in der Zelle aus? – Analyse der Pol-I-Transkription *in vivo*

Während viele Erkenntnisse über die Pol-I-Transkription mittels biochemischer *in vitro*-Experimente gesammelt wurden, spielten – vor allem auch in der Hefe – *in vivo*-Analysen eine große Rolle. Hierbei nutzte man die einfache genetische Manipulierbarkeit der Hefe und konnte über genetisches Screening distinkte Mutanten beschreiben, die einen Einfluss auf die zelluläre rRNA-Synthese hatten, die zur Identifikation von spezifischen Komponenten der Pol-I-Transkriptionsmaschinerie führten [2]. Auch konnte die Assoziation dieser Komponenten mit den endogenen rRNA-Genen in verschiedenen physiologischen Situationen über Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) beschrieben werden. Eine alternative weniger verbreitete Methodik ist das *Chromatin endogeneous cleavage* (ChEC). ChIP- und ChEC-Experimente haben viel dazu beigetragen zu verstehen, wie sich die Assoziation der Pol-I-Transkriptionsmaschinerie und rRNA-Gen-Chromatinzustände in bestimmten physiologischen Situationen oder Hefemutanten ändert [16, 17].

### Was macht die Pol-I-Transkription so einzigartig?

Wieso haben Eukaryoten Pol I „erfunden“? Warum ist die Pol-I-Transkriptionsmaschinerie so besonders gut geeignet, die rRNA zu synthetisieren? Auch hier gibt es Vermutungen, die auf den Ergebnissen biochemischer und struktureller Analysen basieren. Zum einen kann es sicherlich an dem Enzym selbst liegen. Pol I besteht neben gemeinsamen Untereinheiten mit Pol II und/oder III aus sieben spezifischen Untereinheiten (**Abb. 1D**). Diese sind für spezifische Funktionen des Enzyms verantwortlich und ähneln zum Teil dissoziierbaren Transkriptionsfaktoren des Pol-II-Systems. Diese Untereinheiten unterstützen Pol I bei der Initiation, Elongation, der Erkennung und Ausbesserung fehlerhaft elongierter RNA und der Termination. Zum anderen ist es wohl die hohe Initiationsfrequenz des Pol-I-Systems, durch die bis zu 100 elongierende Pol-I-Moleküle gleichzeitig auf einem rRNA-Gen gefunden werden, wie EM-Analysen von transkribierten rRNA-Genen, die *christmas trees*, zeigen (**Abb. 1C**). Die Pol-I-Christbäume wurden sogar schon kurz vor der biochemischen Cha-

rakterisierung der drei Polymerasen beschrieben [13].

Seit der Entdeckung von Pol I, II und III sind etwas mehr als 50 Jahre vergangen und man hat viel über die verschiedenen Transkriptionssysteme gelernt. Ohne Zweifel gibt es noch viel Spannendes zu herauszufinden, bis wir genau verstehen werden, was die Gemeinsamkeiten und Besonderheiten der drei Transkriptionssysteme ausmacht, die den ersten und bedeutenden Schritt der eukaryotischen Genexpression kontrollieren. In Regensburg haben sich die Teams der Biochemie III mit der funktionellen Transkriptionsanalyse (AG Tschochner), der Chromatin-ständigen (*ex vivo*) Analyse (AG Griesenbeck) und der Strukturellen Biochemie zur Strukturaufklärung (AG Engel) zu einem thematischen Schwerpunkt zusammengefunden, um unser Gesamtverständnis der Mechanismen der rDNA-Transkription weiter zu verbessern (**Abb. 1D**). ■

### Literatur

- [1] Warner JR (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24: 437–440
- [2] Nomura M, Nogi Y, Oakes M (2013) Transcription of rDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience, Austin (TX); 2000–2013
- [3] Cormack BP, Struhl K (1992) The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* 69: 685–696
- [4] Reiter A, Hamperl S, Seitz H et al. (2012) The Reb1-homologue Ydr026c/Nsi1 is required for efficient RNA polymerase I termination in yeast. *EMBO J* 31: 3480–3493
- [5] Engel C, Sainsbury S, Cheung AC et al. (2013) RNA polymerase I structure and transcription regulation. *Nature* 502: 650–655
- [6] Girbig M, Misiaszek AD, Müller CW (2022) Structural insights into nuclear transcription by eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00476-9>
- [7] Engel C, Pitzko J, Cramer P (2016) RNA polymerase I-Rrn3 complex at 4.8 Å resolution. *Nat Commun* 7: 12129
- [8] Pils M, Crucifix C, Papai G et al. (2016) Structure of the initiation-competent RNA polymerase I and its implication for transcription. *Nat Commun* 7: 12126
- [9] Pils M, Engel C (2020) Structural basis of RNA polymerase I pre-initiation complex formation and promoter melting. *Nat Commun* 11: 1206
- [10] Engel C, Gubbey T, Neyer S et al. (2017) Structural basis of RNA polymerase I transcription initiation. *Cell* 169: 120–131.e22
- [11] Heiss FB, Daiß JL, Becker P et al. (2021) Conserved strategies of RNA polymerase I hibernation and activation. *Nat Commun* 12: 758
- [12] Baudin F, Murciano B, Fung HKH et al. (2022) Mechanism of RNA polymerase I selection by transcription factor UAF. *Sci Adv* 8: eab5725
- [13] Hamperl S, Wittner M, Babl V et al. (2013) Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Biochim Biophys Acta* 1829: 405–417
- [14] Merkl PE, Pils M, Fremter T et al. (2020) RNA polymerase I (Pol I) passage through nucleosomes depends on Pol I subunits binding its lobe structure. *J Biol Chem* 295: 4782–4795
- [15] Hamperl S, Brown CR, Garea AV et al. (2014) Compositional and structural analysis of selected chromosomal domains from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 42: e2
- [16] Götze H (2010) Function of the upstream activating factor in chromatin structure organization and transcriptional

regulation at the yeast ribosomal DNA. PhD thesis, University of Regensburg

[17] Reiter A, Steinbauer R, Philippi A et al. (2011) Reduction in ribosomal protein synthesis is sufficient to explain major effects on ribosome production after short-term TOR inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 31: 803–817

**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:

Prof. Dr. Herbert Tschochner  
 Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie  
 Lehrstuhl Biochemie III  
 Universitätsstraße 31  
 Universität Regensburg  
 D-93053 Regensburg  
 herbert.tschochner@ur.de  
[www.uni-regensburg.de/biologie-vorklinische-medizin/biochemie-3](http://www.uni-regensburg.de/biologie-vorklinische-medizin/biochemie-3)

#### AUTOREN



#### Michael Pils (M.P.)

Jahrgang 1986. Biologiestudium in Regensburg. 2021 Promotion in Biochemie, Universität Regensburg. Seit 2021 Postdoc am Regensburg Center for Biochemistry (RCB), Universität Regensburg.

#### Herbert Tschochner (H.T.)

Jahrgang 1957. Biologiestudium in Regensburg. 1987 Promotion in Biochemie, Universität Regensburg. 1988–1989 Postdoc Lehrstuhl Biochemie I, Universität Regensburg. 1989–1992 Postdoc am Department of Structural Biology, Stanford University, USA. 1992–2003 Forschungsgruppenleiter Biochemiezentrum Universität Heidelberg. Seit 2003 Leiter des Lehrstuhls Biochemie III am Regensburg Center for Biochemistry (RCB), Universität Regensburg.

#### Joachim Griesenbeck (J.G.)

Jahrgang 1967. Chemiestudium in Freiburg. 1998 Promotion in Biochemie, FU Berlin. 1998–2004 Postdoc am Department of Structural Biology, Stanford University, USA. 2004–2016 Arbeitsgruppenleiter am Lehrstuhl Biochemie III der Universität Regensburg. Seit 2016 Außerplanmäßiger Professor am Lehrstuhl Biochemie III am Regensburg Center for Biochemistry (RCB), Universität Regensburg.

#### Christoph Engel (C.E.)

Jahrgang 1985. Studium Molekulare Biotechnologie in Heidelberg. 2014 Promotion in Strukturbiologie am Genzentrum der LMU München. 2014–2017 PostDoc am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Seit 2018 Emmy-Noether Forschungsgruppenleiter an der Universität Regensburg und seit 2019 Tenure Track Professor für Strukturelle Biochemie.