

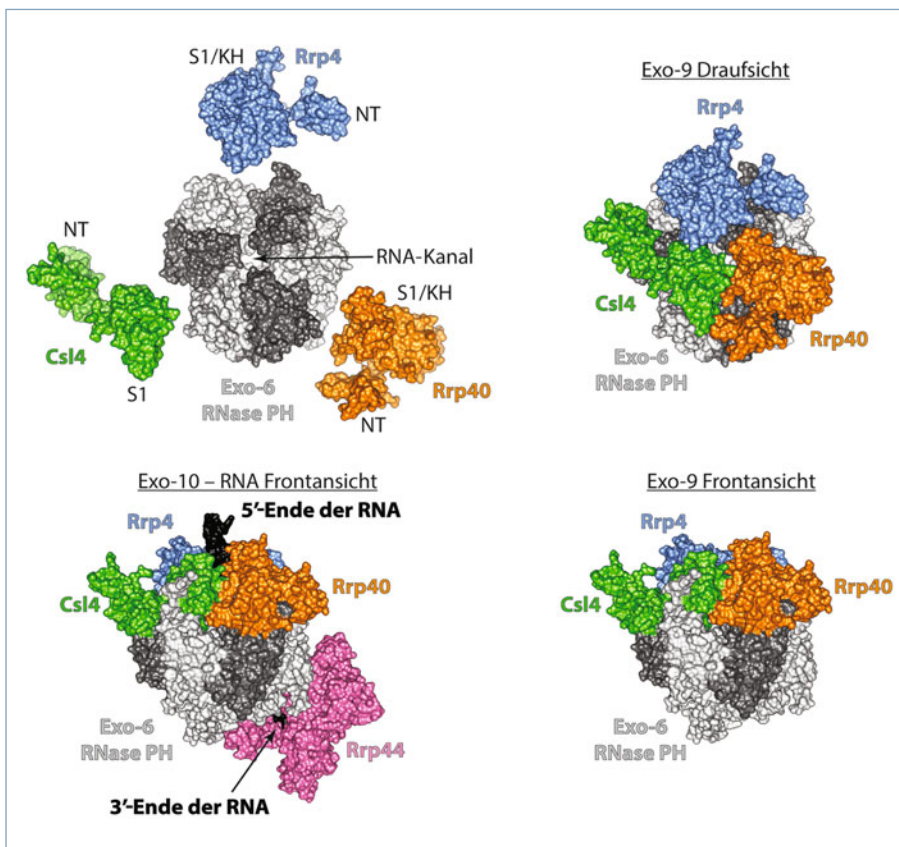
Genexpression

Das RNA-Exosom – eine molekulare Maschine für den RNA-Abbau

SEBASTIAN FALK, ELENA CONTI
 ABTEILUNG FÜR ZELLULÄRE STRUKTURBIOLOGIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR
 BIOCHEMIE, MARTINSRIED

The exosome is an evolutionary conserved macromolecular complex that degrades RNAs from the 3' end. It is present both in the cytoplasm and the nucleus, where it degrades different types of RNAs in yeast, human cells and other eukaryotes studied to date. The exosome is involved in the turnover of mRNAs, ncRNA and tRNAs, but also in the surveillance of faulty pre-mRNAs. In addition to its degradative function it is also involved in the controlled processing of e. g. rRNAs.

DOI: 10.1007/s12268-018-0896-7
 © Die Autoren 2018



▲ **Abb. 1:** Struktur des Exosoms aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Strukturen sind als Oberflächenrepräsentation gezeigt. Der Sechsring aus RNase-PH-Domänen ist hell- und dunkelgrau, die drei Proteine des oberen Rings sind farbig dargestellt. Das 5'- und das 3'-Ende der RNA (schwarz) sind angedeutet. NT: N-terminale Domäne, S1/KH: S1- und KH-Domäne.

■ Der Großteil der genomischen DNA wird von RNA-Polymerasen in RNA überschrieben. Dabei entstehen sowohl Protein-codierende Transkripte (*messenger-RNA* oder mRNA) als auch nicht-codierende RNAs wie Transfer-RNAs (tRNA) und ribosomale RNAs (rRNA). Viele RNAs werden zuerst als Vorläufermoleküle (Prä-RNAs) synthetisiert und anschließend in einem Reifeprozess enzymatisch weiterverarbeitet. Dabei entstehen auch fehlerhafte Transkripte, die zunächst durch die zelluläre Qualitätskontrolle erkannt und schließlich vollständig abgebaut werden müssen. Um eine korrekte und funktionierende Genexpression zu gewährleisten, muss neben der Qualität auch die präzise Menge der verschiedenen RNA-Spezies genau kontrolliert werden. Sowohl bei der Prozessierung als auch beim Abbau spielen spezielle Ribonukleasen eine wichtige Rolle. Diese können die RNA entweder vom 5'- oder vom 3'-Ende her abbauen (Exonukleasen) oder intern spalten (Endonukleasen). Eine der wichtigsten 3'-5'-Exonukleasen ist das RNA-Exosom. Das Exosom wurde in den späten 1990er-Jahren von der Gruppe um David Tollervey entdeckt, als diese die Biogenese von Ribosomen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* untersuchten [1].

Im Rahmen der zellulären Quantitätskontrolle eliminiert das Exosom überschüssige mRNAs im Zytoplasma, wohingegen es im Zellkern unter anderem unerwünschte RNAs abbaut, die durch pervasive Transkription entstanden sind [2, 3]. Bei der Qualitätskontrolle spielt das Exosom eine wichtige Rolle in der Biogenese von tRNAs. Als gut charakterisiertes Substrat ist hier die Initiator-tRNA zu erwähnen. Fehlt dieser Initiator-tRNA eine einzige Methylierung, so ist diese instabil und wird durch das Exosom noch vor dem Export in das Zytoplasma abgebaut [4]. Das Exosom ist jedoch nicht nur am Abbau von RNAs beteiligt, sondern hat auch eine wichtige Funktion bei der präzisen Prozessierung von präRNAs. Bei der Ribosomenbiogenese wird z. B. die 5,8S-Prä-rRNA durch das Exosom präzise am 3'-Ende getrimmt [4]. Welche

Funktion des Exosoms jeweils ausführt, hängt von weiteren Proteinfaktoren ab, die eng mit dem Exosom zusammenarbeiten.

Der Exosom-Kernkomplex

Das RNA-Exosom ist eine konservierte molekulare Maschine mit prokaryotischer Abstammung [2, 4]. In Archaeen und Eukaryoten besteht das Exosom aus neun Untereinheiten, die einen fassartigen Komplex mit einem zentralen Kanal für die Bindung von RNA bilden. Strukturell sind sich das eukaryotische und das archaeale Exosom sehr ähnlich. Die fassartige Struktur besteht aus zwei übereinanderliegenden Ringsystemen (**Abb. 1**). Der obere Ring wird aus drei Proteinen mit S1- und KH-Domänen gebildet. Das untere Ringsystem besteht aus sechs Untereinheiten (Exo-6), die strukturelle Ähnlichkeit zur Ribonuklease PH (RNAse PH) aufweisen (**Abb. 1**). Während der untere Ring in Archaeen die aktiven Zentren des Exosoms beherbergt, sind diese in Eukaryoten nicht mehr intakt. In der Folge ist das eukaryotische Exosom für sich genommen katalytisch inaktiv. Die Nuklease-Aktivität wird indes von einer weiteren, der zehnten Untereinheit (Rrp44) beigebracht, die ausschließlich in Eukaryoten vorkommt [2]. Rrp44 ist eine 3'-5'-Exonuklease und befindet sich unterhalb des unteren Ringsystems des Exosoms [6]. Um an das aktive Zentrum von Rrp44 zu gelangen, muss die RNA den Kanal des Exosoms durchqueren. Dabei befindet sich das 5'-Ende der RNA am oberen Ring und das 3'-Ende reicht bis in das aktive Zentrum der Exonuklease Rrp44 (**Abb. 1**). Folglich wird der aktive Exosomkomplex in Eukaryoten aus zehn verschiedenen Untereinheiten (Exo-10) gebildet. In der Hefe ist Exo-10 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorhanden. In beiden Kompartimenten interagiert das Exosom mit spezifischen Kofaktoren, die jeweils um eine ATP-abhängige RNA-Helikase organisiert sind. Die Helikasen verwenden Energie aus der ATP-Hydrolyse, um strukturierte RNAs zu entfalten oder gebundene Proteine von der RNA zu entfernen. Dies ist notwendig, da der RNA-Kanal zu schmal ist, um strukturierte oder proteingebundene RNAs aufzunehmen. Die Helikasen helfen also, RNA-Moleküle für die Spaltung durch das Exosom vorzubereiten.

Das Exosom im Zytoplasma

Die wichtigste Funktion des Exosoms im Zytoplasma ist der Abbau von nicht mehr

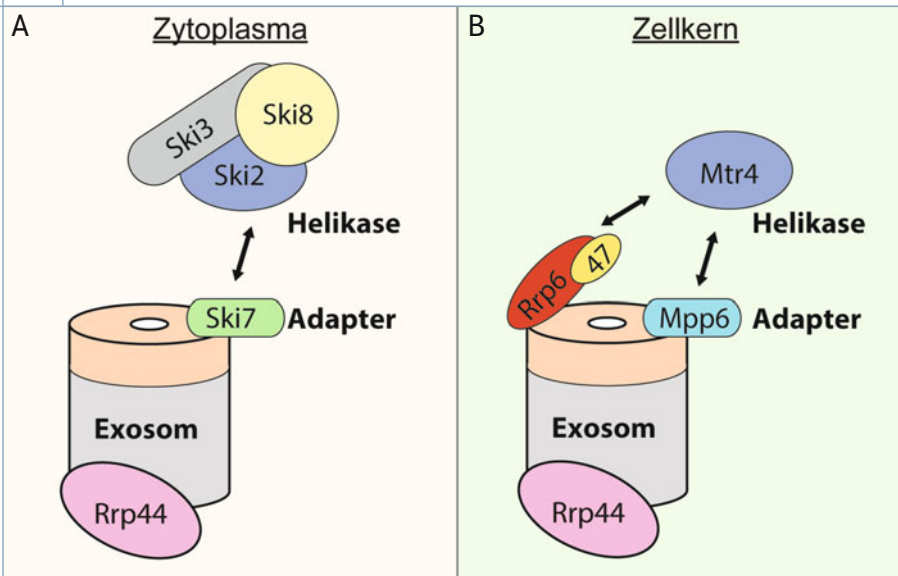
benötigten oder auch fehlerhaften mRNAs. Dazu arbeitet das Exosom eng mit dem Ski-Komplex zusammen. Der Ski-Komplex besteht aus einer RNA-Helikase (Ski2) und den strukturellen Proteinen Ski3 und Ski8 (**Abb. 2A**, [7, 8]). Die Bindung an das Exosom wird durch das Adapterprotein Ski7 vermittelt. Ski7 bindet mit hoher Affinität an das Exosom und enthält zusätzlich noch eine Ski-Komplex-Binderegion [9, 10]. Der Ski-Komplex interagiert nicht nur mit dem Exosom, Ski7 und RNA-Substraten, sondern kann interessanterweise zusätzlich auch direkt an Ribosomen binden [11]. Dabei bindet der Ski-Komplex räumlich in der Nähe jener Region, an der das 3'-Ende der mRNA das Ribosom wieder verlässt. Dies stellt einen direkten Zusammenhang zwischen mRNA-translatierenden Ribosomen und der 3'-5'-mRNA-Degradationsmaschinerie her, die es dem Exosom erlaubt, bestimmte mRNAs rasch abzubauen [11].

Das Exosom im Zellkern

Im Zellkern wechselwirkt das Exosom mit vier Kofaktoren. Zu diesen Kofaktoren zählen die Exonuklease Rrp6 und ihr Bindepartner Rrp47, das kleine Protein Mpp6 sowie die bereits oben erwähnte RNA-Helikase Mtr4 (**Abb. 2B**, [12]). Derzeit haben wir einen strukturellen Überblick darüber, wie Rrp6 an der Oberseite des Exosoms bindet [6] und wie Rrp6 mit Rrp47 interagiert [13]. Der Komplex aus der Exonuklease Rrp6 und Rrp47 hat zwei Funktionen: Zum einen trägt die Exonuklease-Aktivität von Rrp6 zum RNA-Abbau bei, zum anderen fungiert der Rrp6-Rrp47-Komplex als Bindestelle für Mtr4 [13].

Die Funktion des Proteins Mpp6 im nukleären Exosomkomplex war bis vor Kurzem nicht verstanden. Basierend auf Sequenzkonservierung kann das Protein in eine N-terminale, eine mittlere und eine C-terminale Domäne eingeteilt werden. Unter Verwendung von biochemischen Ansätzen in Kombination mit Röntgenkristallographie konnten wir und die Gruppe von Christopher Lima zeigen, dass Mpp6 mit seiner mittleren Domäne an Rrp40, einer Untereinheit des oberen Ringsystems des Exosoms, bindet [14, 15]. Dabei bildet ein Bereich der mittleren Domäne von Mpp6 einen β -Strang, der sich an ein bereits ausgebildetes β -Faltblatt von Rrp40 anlagert (**Abb. 3A**).

Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass bei Patienten, die an einer neu-



▲ **Abb. 2:** Kofaktoren des Exosoms. **A**, im Zytoplasma. **B**, im Zellkern.

rodegenerativen Erkrankung leiden, Mutationen im humanen Ortholog von Rrp40 vorliegen [5]. Eine dieser Mutationen wird durch den Austausch eines konservierten Tryptophans (in Hefe Trp195) zu einem Arginin verursacht [5] und befindet sich ganz in der Nähe der Mpp6-Bindestasche (**Abb. 3B**). Wir haben den Effekt dieser Mutante auf das menschliche Exosom untersucht und konnten zeigen, dass die Bindung des humanen MPP6-Proteins an das mutierte Exosom geschwächt ist [14]. Dies könnte eine mechanistische Erklärung für den Einfluss dieser Mutation auf die Funktionen des nukleären Exosoms sein. Bis jetzt konnten wir aber noch nicht abschließend klären, ob durch die Mutation lediglich die Bindung an MPP6 reduziert ist oder ob

auch weitere Proteine diese Bindestelle verwenden können. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Mpp6 am N-Terminus eine zweite Protein-Protein-Interaktionsregion besitzt, die für die Bindung der Helikase Mtr4 wichtig ist [14]. Das Exosom im Zellkern besitzt somit insgesamt zwei Bindestellen für Mtr4: Die eine liegt, wie oben beschrieben, auf dem Rrp6-Rrp47-Komplex und die zweite auf Mpp6. Beide Stellen sind notwendig, um Mtr4 stabil an das Exosom zu binden und einen effizienten RNA-Abbau zu gewährleisten [14]. Mpp6 nimmt im Zellkern somit – ähnlich wie das zytoplasmatische Protein Ski7 – die Funktion eines Adapterproteins ein, das die Wechselwirkung der Helikase mit dem Exosom unterstützt.

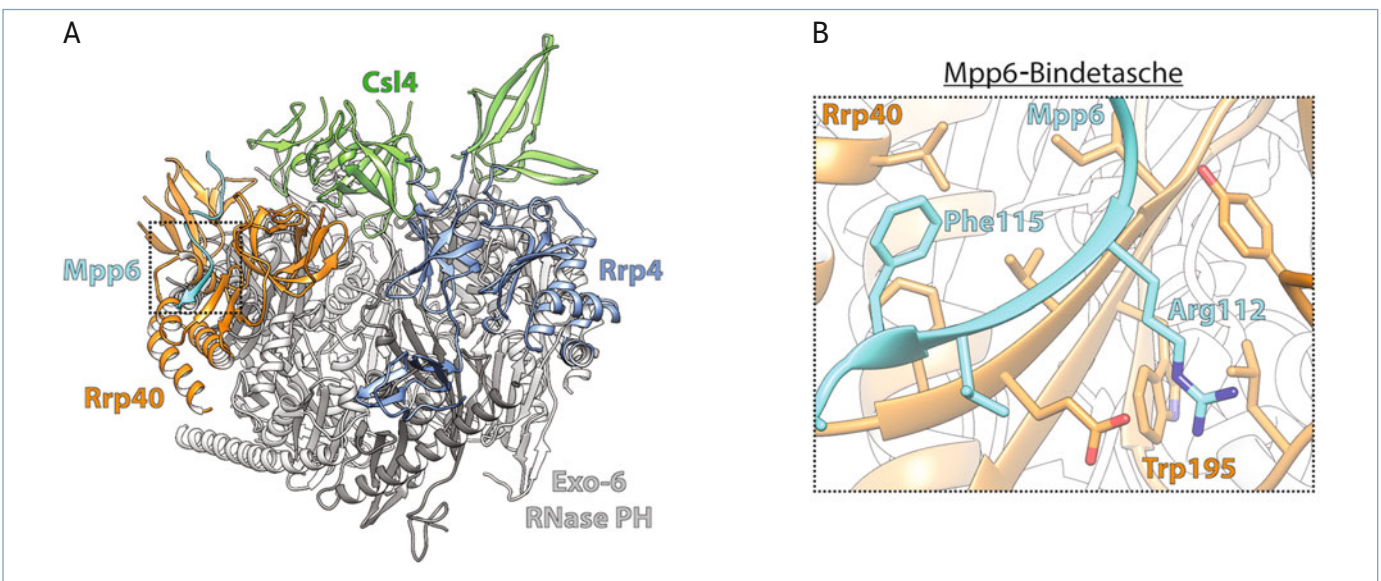
Ausblick

Strukturell sind sowohl die einzelnen Bausteine des Exosoms als auch die zytoplasmatischen und nukleären Kofaktoren zum Großteil gut verstanden. In der Zukunft wird es vor allem darum gehen, das Zusammenspiel des Exosoms mit den Kofaktoren, insbesondere mit den Helikasen, strukturell und mechanistisch zu verstehen.

Ein weiteres molekulares Detail, das es zu verstehen gilt, ist, wie das Exosom verschiedene RNA-Substrate erkennt und zwischen ihnen unterscheidet. Während einige RNAs vollständig abgebaut werden müssen, bedürfen andere RNAs nur präziser Prozessierung. Da bisher zur Strukturanalyse lediglich synthetische RNAs als Modellsubstrate verwendet wurden, werden wir in Zukunft Komplexe des Exosoms mit „natürlichen“ RNA-Substraten, wie z. B. tRNAs oder Prä-Ribosomen, untersuchen. Die bahnbrechenden Fortschritte im Bereich der Kryo-Elektronenmikroskopie ermöglichen nun auch strukturelle Untersuchungen von großen makromolekularen Komplexen, die bislang für eine Analyse durch Röntgenkristallographie nicht geeignet waren.

Danksagung

Wir möchten uns bei Christian Benda, Ingmar Schäfer und Matthias Herlt für das Lesen des Manuskripts bedanken. ■



▲ **Abb. 3:** Struktur des Exosom-Mpp6-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Struktur ist als Bändermodell dargestellt. Mpp6 ist in Türkis gezeigt, die weitere Farbgebung entspricht derjenigen in Abb. 1. **A**, Frontansicht des Exosom-Mpp6-Komplexes. **B**, Vergrößerung der Mpp6-Bindestasche.

Literatur

- [1] Mitchell P, Peffalski E, Shevchenko A et al. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91:457–466
- [2] Januszzyk K, Lima CD (2014) The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol* 24:132–140
- [3] Kilchert C, Wittmann S, Vasiljeva L (2016) The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:227–239
- [4] Chlebowski A, Lubas M, Jensen TH et al. (2013) RNA decay machines: the exosome. *Biochim Biophys Acta* 1829:552–560
- [5] Wan J, Yourshaw M, Mamsa H et al. (2012) Mutations in the RNA exosome component gene *EXOSC3* cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat Genet* 44:704–708
- [6] Makino DL, Baumgärtner M, Conti E (2013) Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* 495:70–75
- [7] Halbach F, Reichelt P, Rode M et al. (2013) The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* 154:814–826
- [8] Zinder JC, Lima DC (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosomes and its cofactors. *Genes Dev* 31:80–100
- [9] Araki Y, Takahashi S, Kobayashi T et al. (2001) Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* 20:4684–4693
- [10] Kowalinski E, Kögel A, Ebert J et al. (2016) Structure of a cytoplasmic 11-subunit RNA exosome complex. *Mol Cell* 63:125–134
- [11] Schmidt C, Kowalinski E, Shanmuganathan V et al. (2016) The cryo-EM structure of a ribosome-Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex. *Science* 354:1431–1433
- [12] Butler JS, Mitchell P (2011) Rrp6, rrp47 and cofactors of the nuclear exosome. *Adv Exp Med Biol* 702:91–104
- [13] Schuch B, Feigenbutz M, Makino DL et al. (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J* 33:2829–2846
- [14] Falk S, Bonneau F, Ebert J et al. (2017) Mpp6 incorporation in the nuclear exosome contributes to RNA channeling through the Mtr4 helicase. *Cell Rep* 20:2279–2286
- [15] Wasmuth EV, Zinder JC, Zattas D et al. (2017) Structure and reconstitution of yeast Mpp6-nuclear exosome complexes reveals that Mpp6 stimulates RNA decay and recruits the Mtr4 helicase. *Elife* 6, doi: 10.7554/eLife.29062

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Elena Conti
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18
D-82152 Martinsried
Tel.: 089-85783604
Fax: 089-85783604
conti@biochem.mpg.de

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.
Open access funding provided by Max Planck Society.

AUTOREN



Elena Conti und Sebastian Falk

Elena Conti

1996 Promotion am Imperial College in London, UK. 1997–1999 Postdoktorandin bei Prof. Dr. J. Kuriyan an der Rockefeller University, New York, USA. 1999–2007 Gruppenleiterin am EMBL Heidelberg. Seit 2007 Direktorin der Abteilung „Zelluläre Strukturbiologie“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Sebastian Falk

2001–2006 Biochemiestudium an der Universität Bayreuth. 2007–2011 Promotion bei Prof. Dr. I. Sinning am Biochemiezentrum der Universität Heidelberg. Seit 2011 Postdoktorand bei Prof. Dr. E. Conti am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.