

RNA-Biologie

Mechanismen des nicht konventionellen RNA-Spleißens

JIRKA PESCHEK

BIOCHEMIE-ZENTRUM, UNIVERSITÄT HEIDELBERG

The cellular pool of RNA is immensely diverse and complex. During their biosynthesis, RNA molecules undergo a vast number of co- and posttranscriptional processing and modification steps. A unique example of RNA processing is the non-conventional splicing of RNAs. This protein-catalysed splicing mechanism is an essential step during tRNA maturation and a main mode of endoplasmic reticulum (ER) stress signalling. Here, I discuss the cellular roles and catalytic machinery of non-conventional splicing in eukaryotes.

DOI: 10.1007/s12268-021-1560-1

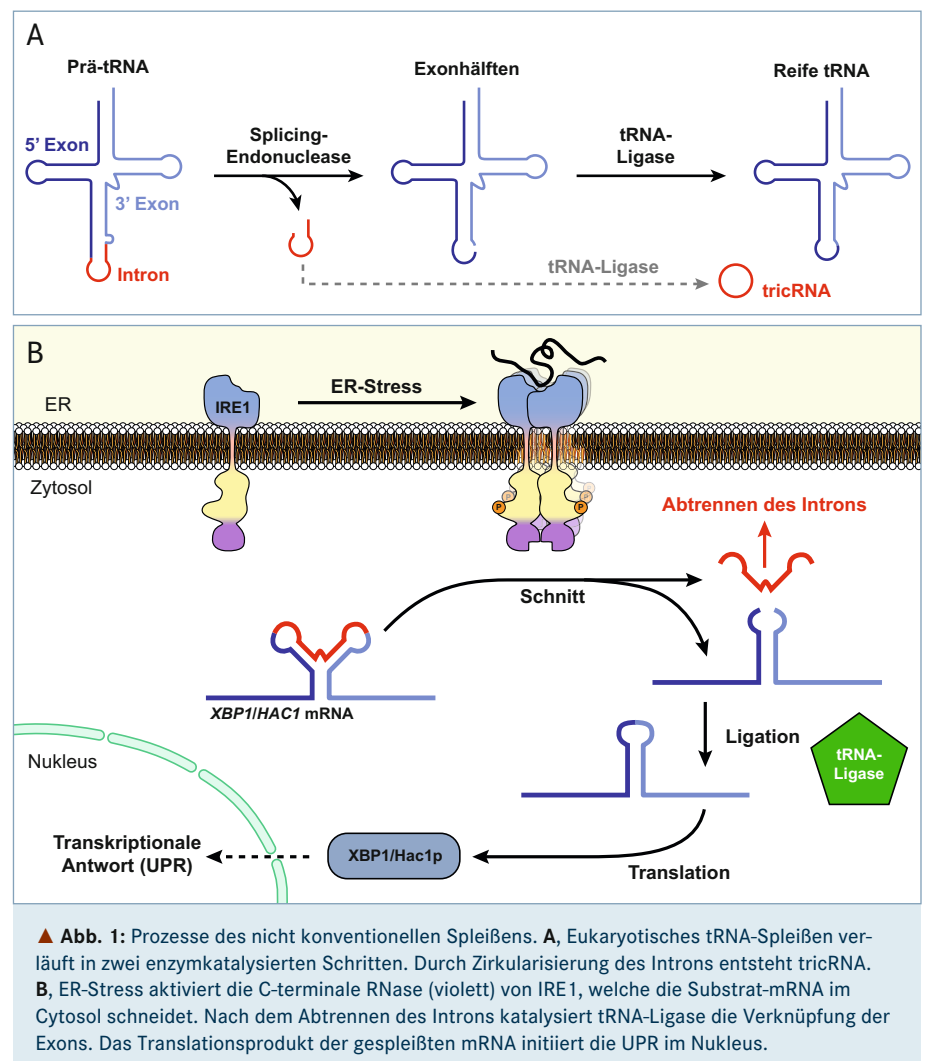
© Der Autor 2021

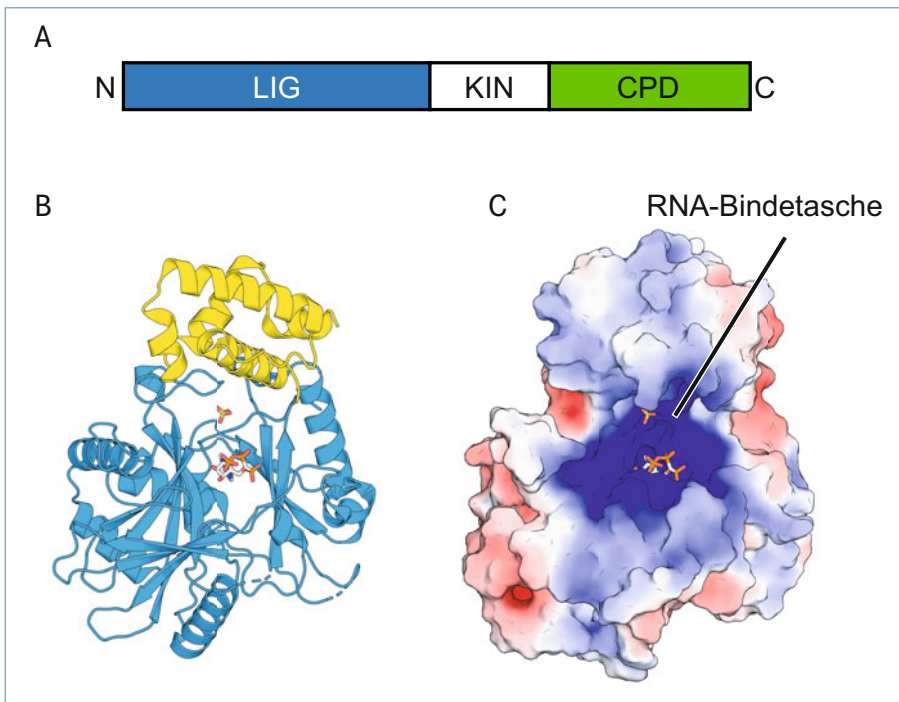
■ Spleißen (oder Splicing) beschreibt das Entfernen nicht codierender Abschnitte (Introns) aus RNA, gefolgt von der Verknüpfung der verbleibenden Exons. Der Begriff des Spleißens bezieht sich auf die Entfernung von Intronsequenzen während der Reifung von prä-mRNA zu mRNA im Zellkern. Es gibt jedoch noch einen weiteren Mechanismus, um Introns aus RNA zu entfernen, das nicht konventionelle Spleißen. Abgesehen von der konzeptionellen Gemeinsamkeit unterscheidet sich dieser Mechanismus fundamental von kanonischem mRNA-Spleißen. Die wesentlichen Unterschiede sind:

- Der nicht konventionelle Mechanismus entfernt Introns aus tRNAs. In einem Sonderfall werden aber auch mRNAs als Teil einer Stressantwort, der *unfolded protein response* (UPR), im Cytosol gespleißt.
- Nicht konventionelles Spleißen ist vollständig proteinkatalysiert, während RNA eine katalytische Komponente beim konventionellen Spleißen von prä-mRNAs darstellt.
- Nicht konventionelles Spleißen bei Eukaryoten ist ein vorwiegend cytosolischer Prozess und nicht auf den Zellkern beschränkt.
- Sowohl die RNA-Sequenzen als auch die Strukturen an den Exon-Intron-Grenzen sind bei beiden Prozessen unterschiedlich.

Introns in tRNA

tRNAs sind ubiquitäre, nicht codierende RNA-Moleküle, die in hoher Konzentration in der Zelle vorkommen. Sie bringen Aminosäuren zu den Ribosomen und erfüllen die essenzielle Aufgabe, den genetischen Code zu übersetzen. Die Biosynthese von tRNA ist ein mehrstufiger Prozess, an dem viele Enzyme beteiligt sind. Introns in tRNA-Genen existieren in allen drei Domänen des Lebens. Sie wurden zuerst in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Während in manchen Archaeen bis zu 70 Prozent aller tRNA-Gene Introns aufweisen, sind es 20 Prozent





▲ **Abb. 2:** Hefe tRNA-Ligase Trl1. **A,** Domänenorganisation von Trl1. **B und C,** Struktur von *Chaetomium thermophilum* Trl1-LIG. **B,** Cartoon-Darstellung mit der kanonischen Adenylyltransferase-Domäne (blau) und der spezifischen C-terminalen Domäne (gelb). **C,** Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotenzials mit Sicht auf die RNA-Bindetasche. Das Nukleotid AMPcPP und ein Sulfation in der Nähe des aktiven Zentrums sind jeweils als Stabmodell dargestellt.

in Hefe und nur etwa 6 Prozent der humanen tRNAs. Eukaryotische tRNA-Introns sind 6–133 Nukleotide lang und befinden sich fast ausschließlich an derselben Position, ein Nukleotid in 3'-Richtung entfernt vom Anticodon [1]. Die Intronsequenzen an dieser konservierten Position innerhalb der Anticodonschleife verhindern die Beteiligung ungespleißter prä-tRNAs an der Translation. In allen Eukaryoten können bestimmte Codons ausschließlich von tRNAs interpretiert werden, deren prä-tRNA ein Intron enthält. Deshalb ist das nicht konventionelle Spleißen von tRNAs ein essenzieller Vorgang. Über den evolutiven Ursprung sowie die Funktion von tRNA-Introns können wir trotz konservierter Eigenschaften bislang nur spekulieren.

Während tRNA-Introns in Bakterien autokatalytisch entfernt werden, ist der Prozess bei Archaeen und Eukaryoten vollständig enzymkatalysiert. Das nicht konventionelle Spleißen von prä-tRNAs erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten [2]: Die Splicing-Endonuklease (SEN) entfernt zuerst das Intron mittels zweier Schnitte, woraufhin eine tRNA-Ligase (nicht zu verwechseln mit Aminoacyl-tRNA-Synthetasen) die Exons unter Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung verknüpft

(**Abb. 1A**). Die gespleißte tRNA kann ihre funktionelle Struktur einnehmen, in der die Anticodonschleife aus sieben ungepaarten Nukleotiden mit dem zentralen Basentriplett des Anticodons besteht. Das Intron wird entweder durch Exoribonukleasen abgebaut oder durch tRNA-Ligase zirkularisiert (**Abb. 1A**). Die resultierende tricRNA (*tRNA intronic circular RNA*) ist eine wenig bekannte RNA-Spezies, deren zelluläre Funktion noch nicht aufgeklärt werden konnte [3].

Nicht konventionelles mRNA-Spleißen während der *unfolded protein response*

Nicht konventionelles Spleißen von mRNA während der *unfolded protein response* (UPR) erfolgt nach einem sehr ähnlichen Mechanismus wie tRNA-Spleißen. Eukaryotische Zellen überwachen und regulieren die Proteinfaltungskapazität ihres endoplasmatischen Retikulums (ER) mittels der UPR. Der evolutiv am stärksten konservierte – und in Hefe einzige – Arm der UPR signalisiert ER-Stress mittels eines einzigartigen, nicht konventionellen mRNA-Spleißens: Fehlgefaltete Proteine im ER führen zur Aktivierung der cytosolischen C-terminalen Endonuklease-Domäne des Transmembran-Stressensors IRE1.

Die aktivierte IRE1-RNase schneidet *HAC1*-mRNA in Hefe oder *XBP1*-mRNA in Metazoa an den Exon-Intron-Grenzen. Analog zum tRNA-Spleißen werden die beiden Exons der mRNA von tRNA-Ligase verknüpft. Translation der gespleißten mRNA produziert einen Transkriptionsfaktor, Hac1p oder XBP1, der im Zellkern die Expression der UPR-regulierten Zielgene anschaltet (**Abb. 1B**, [4]).

Endoribonukleasen und Ligasen bilden ein Enzymgespann

Das nicht konventionelle Spleißen basiert auf dem Zusammenspiel zweier Enzyme: einer Endoribonuklease und einer tRNA-Ligase. Die Endonuklease – SEN oder IRE1 – schneidet ihr entsprechendes RNA-Substrat an den zwei Exon-Intron-Grenzen. Eine Kombination aus RNA-Sequenz und -Struktur bestimmt die exakten Schnittstellen, die stets innerhalb einzelsträngiger RNA-Abschnitte liegen. Die entstandenen Enden der Exons besitzen ein 2',3'-zyklisches Phosphat sowie eine 5'-Hydroxylgruppe [5]. Während IRE1 nach Aktivierung große Cluster mit zahlreichen aktiven Zentren innerhalb der ER-Membran bildet, ist eukaryotische SEN ein Heterotetramer bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten sowie zwei strukturellen Untereinheiten.

Der finale Schritt des nicht konventionellen Spleißens, die Ligation der Exons, wird von tRNA-Ligase katalysiert. Es handelt sich bei der Ligation von tRNA-Hälften und der UPR um dasselbe Enzym. John Abelson und Mitarbeiter gelang die erste Identifizierung der Ligase-Aktivität als Komponente des tRNA-Spleißens in Hefe mit der Entdeckung von Trl1 [6]. Später, kurz nach der Entdeckung der UPR, wurde Trl1 auch als die RNA-Ligase beim Spleißen der *HAC1*-mRNA beschrieben [7]. Trl1 besteht aus drei separaten Enzymaktivitäten (**Abb. 2A**): einer N-terminalen RNA-Ligase (LIG), einer zentralen Polynukleotidkinase (KIN) sowie einer C-terminalen zyklischen-Phosphodiesterase (CPD). KIN und CPD prozessieren die Enden der Exons, damit LIG die kovalente Verknüpfung katalysiert. Dabei bleibt ein 2'-Phosphat übrig, welches von einem weiteren essenziellen Enzym entfernt werden muss, der 2'-Phosphotransferase Tpt1.

Es dauerte mehr als drei Jahrzehnte, bis die ersten Strukturen von Trl1 gelöst wurden. Für die strukturelle Untersuchung wandten wir uns dem unter Strukturbiologen beliebten thermophilen Pilz *Chaetomium thermophilum* zu. Es gelang uns, die Ligase-

Domäne von Trl1 aus *C. thermophilum* zu kristallisieren und die Struktur mit einer Auflösung von 1,9 Å zu lösen (**Abb. 2B**). Die neu gewonnenen Einblicke in die Struktur der tRNA-Ligase Trl1 haben es ermöglicht, die RNA-Bindetasche und die beteiligten Reste zu identifizieren [8].

Während die vier SEN-Untereinheiten von Mensch und Hefe zueinander homolog sind, besteht keine phylogenetische Verwandtschaft zwischen den entsprechenden tRNA-Ligasen. Die humane tRNA-Ligase wurde erst 2011 auf elegante Weise durch biochemische Fraktionierung identifiziert [9]. Sie besteht aus einem pentameren Komplex mit der RNA-Ligase RtcB, vier weiteren, teilweise nicht charakterisierten, Proteinen und benötigt das kleine Protein Archease, um wiederholt katalytische Zyklen zu durchlaufen. Der evolutive Ursprung der Ligase vom RtcB-Typ ist sehr interessant. RtcB besitzt direkte Homologe in Bakterien und Archaeen, kommt aber nicht in Pilzen und Pflanzen vor,

welche ausschließlich tRNA-Ligasen vom oben beschriebenen Trl1-Typ besitzen [1].

Eine direkte physikalische Interaktion zwischen Endonuklease und RNA-Ligase konnte bisher für keines der Enzympaare des nicht konventionellen Spleißens gezeigt werden. Wie arbeiten die beiden Enzyme zusammen? Findet eine direkte Übergabe des RNA-Substrats statt? Eine erste Antwort auf diese Fragen besitzen wir für das Spleißen von *XBPI/HAC1*-mRNA während der UPR. Wir konnten zeigen, dass eine RNA-intrinsische Konformationsänderung die Entfernung des abgetrennten Introns unterstützt. Dabei werden neue Basenpaare zwischen den Exons gebildet, was die RNA-Hälften über nicht kovalente Interaktionen zusammenhält. Die zu ligierenden Enden der Exons werden so in unmittelbare Nähe gebracht, was eine effiziente und korrekte Verknüpfung durch tRNA-Ligase erlaubt [10]. Die RNA-Struktur im Bereich der Exon-Intron-Grenzen spielt also eine entscheidende Rolle. Angesichts

der kompakten und definierten Tertiärstruktur von tRNAs ist ein ähnlicher Mechanismus auch beim tRNA-Spleißen denkbar. Ein verbessertes Verständnis der subzellulären Lokalisation dieser Vorgänge und der beteiligten Enzyme wird dabei helfen, das Zwischenspiel aller Komponenten besser zu verstehen.

Auch wenn die grundlegenden Mechanismen der Enzyme aufgeklärt sind, ist interessanterweise wenig über die Interaktion mit ihren RNA-Substraten bekannt. Was ist die Spezifität dieser Enzyme? Wie koordinieren tRNA-Ligasen die Enden der beiden Exons? Es gibt für keines der eukaryotischen Enzyme, die nicht konventionelles Spleißen katalysieren, eine Struktur im Komplex mit RNA. Auf lange Sicht möchten wir in unserem Labor auf der Basis biochemischer und struktureller Methoden neue Erkenntnisse zum Modus der RNA-Substraterkennung aller beteiligten Enzyme gewinnen.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Das Wechselspiel mit anderen RNA-Prozessen

Von den über 170 bekannten RNA-Modifizierungen treten mehr als 90 in tRNAs auf. tRNA stellt die am häufigsten modifizierte Klasse von RNA dar. Modifizierte Basen beeinflussen alle wesentlichen Funktionen von tRNA: Aminoacylierung, tRNA-Ribosom-Interaktion, tRNA-Stabilität und Decodierung. Während wir zunehmend die Funktion einzelner modifizierter Basen verstehen, ist nur wenig über das Wechselspiel von tRNA-Modifizierung und tRNA-Prozessierung bekannt. Studien in Hefe haben gezeigt, dass manche Basenmodifizierungen die Anwesenheit eines Introns benötigen, wohingegen andere erst nach dem Spleißen stattfinden [11]. In Zukunft wollen wir neue Erkenntnisse über dieses hierarchische Gefüge von Modifizierung und Spleißen während der tRNA-Biosynthese gewinnen.

Ausgehend von unserer Trl1-LIG-Struktur (**Abb. 2B**) konnten wir zeigen, dass die Ligation von *HAC1*-mRNA während der UPR mit RNA-Abbau durch Exoribonukleasen konkurriert [8]. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die von IRE1 geschnittene mRNA abgebaut wird, falls die Exon-Exon-Ligation fehlschlägt. Die Exoribonukleasen verhindern dadurch die Translation von mRNA-Fragmenten und somit die Produktion trunkierter UPR-Transkriptionsfaktoren. Somit fungiert das kinetische Gegenspiel von tRNA-Ligase und Exoribonukleasen als ein Schritt der Qualitätskontrolle des nicht konventionellen Spleißens während der UPR.

Die duale Funktion von tRNA-Ligasen beim tRNA-Spleißen sowie der UPR zeigt die Vielseitigkeit dieser Enzyme auf. Zahlreiche biochemische Studien haben zudem gezeigt,

dass synthetische RNA-Substrate ligiert werden können, solange die RNA-Enden in räumlicher Nähe sind und geeignete funktionelle Gruppen tragen. Diese Eigenschaft ist sehr interessant, wenn man bedenkt, dass Eukaryoten nur ein Enzym besitzen, das einzelsträngige RNAs ligieren kann: eine tRNA-Ligase vom Trl1- oder RtcB-Typ. Es besteht die Möglichkeit, dass wir das volle Spektrum zellulärer Prozesse unter Beteiligung von tRNA-Ligasen noch nicht kennen. Laufende Studien in unserem Labor haben zum Ziel, dieses Potenzial zu beleuchten und die Enzyme des nicht konventionellen Spleißens im Wechselspiel mit anderen Prozessen zu verstehen.

Literatur

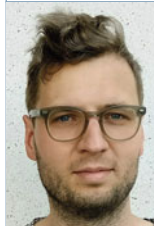
- [1] Popow J, Schleiffer A, Martinez J (2012) Diversity and roles of (t)RNA ligases. *Cell Mol Life Sci* 69: 2657–2670
- [2] Peebles CL, Ogden RC, Knapp G, Abelson J (1979) Splicing of yeast tRNA precursors: a two-stage reaction. *Cell* 18: 27–35
- [3] Lu Z, Filonov GS, Noto JJ et al. (2015) Metazoan tRNA introns generate stable circular RNAs in vivo. *RNA* 21: 1554–1565
- [4] Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081–1086
- [5] Peebles CL, Gegenheimer P, Abelson J (1983) Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane-associated yeast endonuclease. *Cell* 32:525–536
- [6] Greer CL, Peebles CL, Gegenheimer P, Abelson J (1983) Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing. *Cell* 32: 537–546
- [7] Sidrauskis C, Cox JS, Walter P (1996) tRNA Ligase Is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 87: 405–413
- [8] Peschek J, Walter P (2019) tRNA ligase structure reveals kinetic competition between non-conventional mRNA splicing and mRNA decay. *eLife* 8: e44199
- [9] Popow J, Englert M, Weitzer S et al. (2011) HSPC117 is the essential subunit of a human tRNA splicing ligase complex. *Science* 331: 760–764
- [10] Peschek J, Acosta-Alvear D, Mendez AS, Walter P (2015) A conformational RNA zipper promotes intron ejection during non-conventional XBP1 mRNA splicing. *EMBO reports* 16:1688–1698
- [11] Hopper AK (2013) Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194: 43–67

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. Jirka Peschek
 Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg
 (BZH)
 Im Neuenheimer Feld 328
 D-69120 Heidelberg
www.bzh.uni-heidelberg.de/peschek/
jirka.peschek@bzh.uni-heidelberg.de

AUTOR



Jirka Peschek

2002–2007 Biochemiestudium an der TU München. 2008–2012 Promotion bei Prof. Dr. J. Buchner an der TU München. 2013–2020 Postdoktorand bei Prof. Dr. P. Walter an der University of California, San Francisco, USA. Seit 2020 Emmy Noether-Nachwuchsgruppenleiter am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg.