

PHD TÉZISEK

**A *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* U3 KIS NUKLEOLÁRIS RNS
SZERKEZETÉNEK ELEMZÉSE *IN VIVO* KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT:
FUNKCIONÁLIS VONATKOZÁSOK**

***/STRUCTURAL ANALYSIS OF U3 SMALL NUCLEOLAR RNA OF CHLAMYDOMONAS
REINHARDTII IN VIVO: FUNCTIONAL IMPLICATIONS/***

ÍRTA

ANTAL MÁRIA

TÉMAVEZETŐK:

SOLYMOSY FERENC

KISS TAMÁS

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT

NÖVÉNYBIOLÓGIA INTÉZET

SZEGED

2001

ÖSSZEFOGLALÁS

Az U3 kis nukleoláris RNS (angol neve után rövidítve: U3 snoRNA) a C/D boxot tartalmazó kis mólsúlyú, nukleoláris lokalizációjú RNS család legnagyobb kópia számú képviselője. Ribonukleoprotein (RNP) komplex formájában létfontosságú szerepet tölt be a pre-riboszómális RNS (pre-rRNS) érésében.

Munkánk során a *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*) egysejtű zöldalga U3 kis nukleoláris RNS másodlagos szerkezetének elemzését végeztük el *in vivo* körülmények között. Az RNP-ben az U3 RNS molekulához mind a C/D box RNS-ekkel közös mind U3 specifikus fehérék kötődnek. Az RNS-fehérje kapcsolódásokról a mai napig kevés információ áll rendelkezésünkre. Az *in vivo* és kontrollként *in vitro* körülmények között kapott kémiai modifikációs és enzimátikus hasítási mintázatok összehasonlításával lehetőségünk volt: a) a *Cre* U3 RNS másodlagos szerkezetének meghatározására és a potenciális fehérjekötő helyek feltérképezésére, b) a közelmúltban publikált 18S rRNS és U3 RNS közötti direkt bázispárosodást leíró modellek további finomítására.

KONKLÚZIÓK:

A *CRE* U3 KIS NUKLEOLÁRIS RNS 5' DOMAINJE

/1/ A *Cre* U3 RNS elsődleges és másodlagos szerkezete az eddig azonosított U3 RNS-ek közül a magasabbrendű növények U3 RNS-ével mutat legnagyobb homológiát.

/2/ A magasabbrendű növényekben az U3 RNS 5' domainje elméleti modellek alapján kettős hajtűhurok struktúrát vesz fel. A *Cre* U3 RNS 5' domainje esetében kísérleti eredményeink igazolják ezt a szerkezetet *in vitro* körülmények között, azonban *in vivo* a kettős hajtűhurok struktúra helyett az 53 – 67 nukleotidok közötti régió egyszálú szakaszként értelmezhető.

/3/ A hélixeket összekötő egyszálú régiók, az ún. hinge 1 és hinge 2 a *Cre* U3 RNS esetében magasabbrendű növények U3 RNS-ével összevetve hosszabb.

/4/ *In vivo* végzett modifikációs kísérleti eredményeink alapján a *Cre* U3 RNS és a 18S rRNS közötti bázispárosodásra módosított modellt állítottunk föl.

A CRE U3 KIS NUKLEOLÁRIS RNS 3' DOMAINJE

/5/ A computeres model által javasolt Stem/Loop II, Central Stem és a 3' Stem szerkezeti egységek megléte modifikációs kísérleteink alapján igazolható. A Stem II, bár egy erősen compact struktúrát alkot *in vitro*, *in vivo* jóval relaxáltabb.

/6/ A Cre U3 RNS 3' domainjében mindössze a 3' Stem és a B box régió ad azonos modifikációs mintázatot *in vitro* és *in vivo*.

/7/ A Stem/Loop III régió (Stem/Loop III, Central Stem, Multibranch Loop) modifikációs mintázata nagyon heterogén oldatban. A molekula ezen része a WT-1 szerkezet mellett egy alternatív ún. WT-2 kétdimenziós szerkezetet is kialakít. A Stem/Loop III instabilitásáért felelős szerkezeti elemeket föltérképeztük szubsztitúciós (M) és deléciós (ΔM) mutánsok segítségével.

/8/ A Cre U3 RNS 3' domainje *in vivo* a WT-1 struktúrát veszi fel. A sejtmagban az U3 RNS-hez kötődő snoRNP fehérjék stabilizálják a WT-1 struktúra kialakulását, és párhuzamosan gátolják a WT-2 létrejöttét.

/9/ A C'D és a B/C motívumok a fehérje kötődésben esszenciális szerepet töltenek be, így várható volt, hogy fehérjék jelenlétében és *in vitro* körülmények között modifikációs mintázatok jelentős eltéréseket mutat. *In vivo* mindkét elem a 15.5kD-os fehérje kötő helyre jellemző struktúrába is hajtogatható. Sajnálatos módon, mivel csak az adenine és cytosine bázisokat tudtuk térképezni a közvetlen fehérje kötő helyet nukleotid szinten nem tudtuk megadni.

/10/ Oldatban a Cre U3 RNS C box szekvenciája –amennyiben a WT-1 konformációt veszi fel– a Loop III régióval képes egy 5 bázispárból álló pseudoknot kialakítására. Szisztematikus vizsgálatok után megállapítottuk, hogy az eddig ismert összes U3 RNS-ben a C box – Loop III típusú pseudoknot szerkezet létrejöhet, amely kiváló protein kötő helyként funkcionálhat.

BEVEZETÉS

A kis nukleoláris RNS-ek (snoRNA) az eukaryóta sejmagban létfontosságú szerepet töltenek be a pre-riboszómális RNS-ek posttranszkripciósi érésében. Néhány kis nukleoláris RNS a rRNS prekursor többlépcsős hasítási folyamatában vesz részt, melynek során képződnek a 18S, 5.8S és a 25S/28S rRNS-ek (Eichler and Craig, 1994; Raue and Planta, 1995). A kis nukleoláris RNS-ek döntő többsége mint szekvencia specifikus ún. guide RNS működik. Konzervált szekvencia elemeik ill. másodlagos szerkezeti elemek jelenléte alapján két fő csoportba sorolhatók. A H és ACA boxot tartalmazó kis nukleoláris RNS-ek a rRNS pszeudouridilációját irányítják (Bortolin et al., 1999; Ganot et al., 1997a; Ganot et al., 1997b), a C és D boxot tartalmazók a rRNS 2'-O-methylációjáért felelősek (Kiss-László et al., 1998; Kiss-László et al., 1996).

Az U3 RNS, jelen disszertáció témája, a C/D boxot tartalmazó kis nukleoláris RNS-ek családjába sorolható. Az U3 RNS génje a telomeráz RNS génje mellett az eddig ismert egyetlen olyan gén, melyet különböző RNS polimeráz enzim ír át a különböző élőlényekben (Kiss et al., 1991; Greider, 1996). Laboratóriumunkban a *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*) egyszéjtű zöldalga kis nukleáris RNS-einek azonosításával és funkcionális vizsgálatát végeztük el az elmúlt években. Kísérleteink igazolták, hogy a *Cre* U3 RNS génjét a polymeráz III írja át (Antal et al., 2000). *In vivo* az U3 RNS fehérjékhez kapcsolódva ribonukleoprotein komplex (RNP) formájában működik a pre-rRNS A0, A1 és A2 helyeinek hasításában (Beltrame and Tollervey, 1995; Hughes and Ares, Jr. 1991). Az U3 RNS és a pre-rRNS intermolekuláris bázispárosodására az első modellt filogenetikai összehasonlító elemzések alapján Hugues javasolta (Hughes, 1996), majd élesztőben végzett *in vivo* kísérletek eredményei szerint Méreau módosította (Méreau et al., 1997).

Az U3 RNS molekula az evolúció során nagyfokú konzerváltságot őrzött meg. Minden U3 RNS molekula hat konzervált szekvencia elemet tartalmaz, melyek közül az A, A' és B motívum U3 specifikus, a C, C' és D elem minden C/D box RNS-re jellemző. Az U3 RNS molekula kétdimenziós szerkezete 5' és 3' domainre osztható (Parker and Steitz, 1987; Jeppesen et al., 1988; Ségault et al., 1992; Hartshorne and Agabian, 1994; Méreau et al., 1997; Fournier et al., 1998).

Az 5' domaint funkcionális domainnek is nevezzük. Itt található az A és A' box, melyek a 18S rRNS-sel lépnek interakcióba, hogy a hasítási helyek kijelölése mellett elősegítsék a 18S

rRNS-ben a pseudoknot szerkezet korrekt hajtogatódását (Hughes, 1996). Az U3 RNS egy másik, nem konzervált szekvenciájú egyes szálú régiója az 5'-ETS szakaszhoz kapcsolódik (Beltrame and Tollervey, 1995). Az 5' domain másodlagos szerkezete nem egységes, egy hajtúhurok struktúrát alkot a magasabbrendű eukaryótákban, míg kettős hajtúhurok szerkezetet vesz fel élesztőben és magasabbrendű növényekben.

A 3' domain az RNP komplex fehérjéinek kötődési helye. A B/C és C'/D boxok két, feltételezhetően konzervált másodlagos szerkezetű motívumot alkotnak, melyek korábbi kísérletek alapján a kötődési helyeket képezhetik (Venema et al., 2000; Lukowiak et al., 2000; Colley et al., 2001).

Napjainkig több modellt állítottak föl mind az U3 RNS-rRNS, mind az U3 RNS-fehérje interakciók kialakulására. Azonban még az sem pontosan tisztázott, hogy milyen elsődleges és másodlagos szerkezeti elemek szükségesek akár magának az RNP-nek a felépítéséhez, akár a rRNS-sel való kötődéshez. Munkánk a *Chlamydomonas reinhardtii* U3 kis nukleoláris RNS szerkezetének meghatározásával *in vivo* körülmények között elsőként mutatja be egy növényi U3 RNS másodlagos szerkezetét és lehetőséget ad arra, hogy filogenetikailag kiszélesítve a vizsgált RNS-ek körét, a korábbi modelleket pontosítsuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalga CW15-ös sejtfalet mutáns törzsével végeztük kísérleteinket. Az izolált U3 RNS-t szekvenáltuk, majd cDNS-t készítettünk és klónoztuk (pCRU3WT). Ez a konstrukció szolgált templátul az *in vitro* transzkripció kísérletekhez (Chabot, B. 1994).

A *Cre* U3 RNS 5' domainjét Lück programjának segítségével hasonlítottuk össze más U3 RNS-ekkel (Lück et al., 1999).

Az *in vitro* modifikációs kísérletekben DMS, CMCT és kethoxal kémiai reagenseket valamint RNase V1 enzimet alkalmaztunk (Ehresmann et al., 1987). Az *in vivo* modifikációs kísérleteket DMS-sel végeztük (Zaug és Cech 1995). A modifikációk és enzimatis hasítások helyeit primer extenziós kísérletekben végjelölt oligonukleotidok felhasználásával határoztuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUZZIÓ

Kísérleti munkánk célja a *Chlamydomonas reinhardtii* U3 kis nukleoláris RNS másodlagos szerkezetének meghatározása *in vivo* körülmények között és az eredmények alapján funkcionális modell felállítása volt.

1. Elsőként filogenetikai összehasonlító módszer segítségével komputeres másodlagos szerkezeti modellt készítettünk az U3 RNS-ek 5' domainjére vonatkozóan. Ez alapján megállapítható, hogy a *Cre* U3 RNS 5' domainjének másodlagos szerkezete a magasabbrendű növényi U3 RNS-ekkel mutat a legnagyobb homológiát, ennek megfelelően kettős hajtűhurok struktúrát alkot.
2. Az 5' domain modifikációs mintázata *in vitro* és *in vivo* jelentős eltérést mutat. *In vitro* a kísérleti eredmények alátámasztják az elméleti modellt, azonban *in vivo* a szerkezet teljesen felbomlik. Az *in vivo* modifikációs mintázat alapján a Hugues és Méreau által javasolt modelleket módosítottuk.
3. A Stem/Loop Ib-ben a stem 5' szára nagy részt védett, ami az 5'-ETS-sel való bázispárosodásra utalhat. Ezt támasztja alá az is, hogy az összes vizsgált növény esetében hasonló bázispárosodás ezzel a szakasszal létrejöhet.
4. A 3' domain *in vitro* modifikációs mintázata arra utal, hogy fehérjék hiányában ez a régió legalább két alternatív szerkezetbe hajtogatódhat (WT-1, WT-2). Deléciós és szubsztitúciós mutánsok vizsgálatával sikerült stabilizálni mind a WT-1 mind a WT-2 szerkezetet.
5. A 3' domain az élő sejtben kísérleti eredményeink alapján a WT-1 szerkezetet veszi fel.
6. A C és a C' box *in vivo* modifikációs mintázata alapján feltételezhető, hogy a két fehérjekötő motívumként tekintett régió fölveheti a 15.5 kD-os fehérje kötőhelyére jellemző szerkezetet.
7. A 3' domainben *in vitro* a C box és a Stem-loop III között a modifikációs eredmények szerint kialakulhat egy pszeudoknot struktúra. A pszeudoknot kialakulásának lehetősége evolúciósan konzervált.

IRODALOM

- Antal, M., Kis, M., Mougín, A., Steger, G., Boros, E., Jakab, G., Branlant, C., and Solymosy, F. (2000). *Nucleic Acids Res.* **28**, 2959-68.
- Beltrame, M. and Tollervey, D. (1995). *EMBO J.* **14**, 4350-4356.
- Bortolin, M.L., Ganot, P., and Kiss, T. (1999). *EMBO J.* **18**, 457-469.
- Chabot, B. (1994). *Practical Approach Higgins, S.J. Hames, B.D. IRL Press, Oxford, Volume 1*, 1-29.
- Colley, A., Beggs, J.D., Tollervey, D., and Lafontaine, D.L. (2001). *Mol. Cell Biol.* **20**, 7238-46.
- Eichler, D.C. and Craig, N. (1994). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **49**, 197-239.
- Ehresmann, C., Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Ebel, J.P., and Ehresmann, B. (1987). *Nucleic Acids Res.* **15**, 9109-9128.
- Fournier, R., Brule, F., Segault, V., Mougín, A., and Branlant, C. (1998). *RNA* **4**, 285-302.
- Ganot, P., Bortolin, M.L., and Kiss, T. (1997a). *Cell* **89**, 799-809.
- Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1997b). *Genes Dev.* **11**, 941-956.
- Greider, C.W. (1996). *Annu. Rev. Biochem.* **65**:337-65, 337-365.
- Hartshorne, T. and Agabian, N. (1994). *Nucleic Acids Res.* **22**, 3354-3364.
- Hughes, J.M. and Ares, M., Jr. (1991). *EMBO J.* **10**, 4231-4239.
- Hughes, J.M. (1996). *J. Mol. Biol.* **259**, 645-654.
- Jeppesen, C., Stebbins-Boaz, B., and Gerbi, S.A. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 2127-2148.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachelier, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). *Cell* **85**, 1077-1088.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., and Kiss, T. (1998). *EMBO J.* **17**, 797-807.
- Kiss, T., Marshallsay, C., and Filipowicz, W. (1991). *Cell* **65**, 517-526.
- Lukowiak, A.A., Granneman, S., Mattox, S.A., Speckmann, W.A., Jones, K., Pluk, H., Venrooij, W.J., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2000). *Nucleic Acids Res.* **2000**, Sep. 15;28(18):3462-71. **28**, 3462-3471.
- Lütk, R., Graf, S., and Steger, G. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27**, 4208-4217.
- Mereau, A., Fournier, R., Gregoire, A., Mougín, A., Fabrizio, P., Luhrmann, R., and Branlant, C. (1997). *J. Mol. Biol.* **273**, 552-571.
- Parker, K.A. and Steitz, J.A. (1987). *Mol. Cell Biol.* **7**, 2899-2913.
- Raue, H.A. and Planta, R.J. (1995). *Gene Expr.* **5**, 71-77.
- Segault, V., Mougín, A., Grégoire, A., Banroques, J., and Branlant, C. (1992). *Nucleic Acids Res.* **20**, 3443-3451.
- Venema, J., Vos, H.R., Faber, A.W., van Venrooij, W.J., and Raue, H.A. (2000). *RNA* **6**, 1660-71.

PUBLIKÁCIÓK

1. Antal, M., Mougín, A., Kis, M., Boros, E., Steger, G., Jakab, G., Solymosy, F., and Branlant, C. (2000). Molecular characterization at the RNA and gene levels of U3 snoRNA from a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2957-2968.
2. Jakab, G., Mougín, A., Kis, M., Pollak, T., Antal, M., Branlant, C., and Solymosy, F. (1997). *Chlamydomonas* U2, U4 and U6 snRNAs. An evolutionary conserved putative third interaction between U4 and U6 snRNAs which has a counterpart in the U4atac-U6atac snRNA duplex. *Biochimie* **79**, 387-395.
3. Kiss, T., Jakab, G., Antal, M., Palfi, Z., Hegyi, H., Kis, M., and Solymosy, F. (1988a). Plant small nuclear RNAs. V. U4 RNA is present in broad bean plants in the form of sequence variants and is base-paired with U6 RNA. *Nucleic Acids Res.* **16**, 5407-5426.
4. Kiss, T., Antal, M., Hegyi, H., and Solymosy, F. (1988b). Plant small nuclear RNAs. IV. The structure of U1 RNA from *Chlorella saccharophila*: a phylogenetic support, in terms

of RNA structure, for the probable interaction between U1 and U2 and RNPs during the splicing of pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.* *16*, 2734

5. Kiss, T., Antal, M., and Solymosy, F. (1987a). Plant small nuclear RNAs. III. The complete primary and secondary structure of broad bean U2 RNA: phylogenetic and functional implications. *Nucleic Acids Res.* *15*, 1332
6. Kiss, T., Antal, M., and Solymosy, F. (1987b). Plant small nuclear RNAs. II. U6 RNA and a 4.5S-like RNA are present in plant nuclei. *Nucleic Acids Res.* *15*, 543-560.

Acknowledgements

I am highly indebted to Prof. Ferenc Solymosy for providing me with the possibility of starting my scientific carrier in his group. His excellent scientific guidance, and constructive criticism helped me from the first moment until now.

I have much to be thankful to Prof Tamás Kiss. He introduced me into the most up-to-date laboratory methods and into the most efficient way of experimentation. I appreciated very much being member of his research team.

I thank the referees Prof. András Lipták and Prof. Ernő Duda for the critical reading of my thesis.

I thank Prof. Christiane Branlant and her laboratory for her fruitful cooperation in structure probing experiments and for the publication of the results.

I thank my colleagues in Szeged, Mihály Kis, Tamás Pollák, Éva Boros, Beáta Erika Jády, Arnold Mihály Kis, and Ildikó Borka for creating a pleasant atmosphere and for their cooperation in my laboratory work.

I am grateful to my colleagues in Nancy, Annie Mougín, Ágnes Méreau and Klaus Hartmuth, who gave me a hand in managing everyday life and laboratory work during my stay in France.

I would like to thank my parents and sons for their love and tolerance during my