B 4147

PhD TÉZISEK

"IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF NOVEL SMALL NUCLEAR RNAS"

ÚJ NUKLEÁRIS KIS RNS-EK JELLEMZÉSE

ÍRTA:

KISS MIHÁLY ARNOLD

TÉMAVEZETŐK:

KISS TAMÁS

SOLYMOSY FERENC

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 13.

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA, SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT
NÖVÉNYBIOLÓGIA INTÉZET ÉS SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM, TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR, SZEGED
ÉS
LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE EUCARYOTE DU CNRS
UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III
TOULOUSE, FRANCE

2005

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtmag számos kis méretű, rendkívül stabilis ún. „nem-kódoló" nukleáris kis RNS-t (small nuclear RNA, snRNS) tartalmaz. Nem-kódoló RNS-ek döntő szerepet játszanak számos alapvető sejtfolyamatban, mint például a génműködés szabályozásában. Minden frissen átíródott RNS molekula több érési lépésen megy keresztül, míg funkcionálisan aktív RNS-sé válik. Az snRNS-ek legnagyobb csoportja más RNS-ek érési folyamataihoz szükséges poszt-transzkripciós módosítások vagy nukleolítikus hasítások irányításában vesz részt.

A nukleáris kis RNS-ek fehérjékkel kapcsolódva ribonukleoprotein komplexeket ún. ribonukleoprotein partikulumokat (snRNP) alkotnak. Egy snRNP egy rövid, általában 60-300 nukleotid hosszú RNS molekulából és számos fehérje alegységből áll. Sok esetben a szubsztrát RNS és az snRNS között kialakuló bázispárosodás a szubsztrát molekula szekvencia specifikus felismeréséhez szükséges, míg a fehérje komponensek mint katalitikus ill. szabályozó alegységek vesznek részt a reakcióban.

Sejtmagon belüli eloszlásuk alapján megkülönböztethetünk nukleoplazmatikus és nukleoláris snRNP-ket (Yu et al., 1999). A legnagyobb mennyiségben előforduló nukleoplazmatikus snRNP-k, az U1, U2 és U4-U6 szplájszoszómális snRNP-k, a prekurzor hírvivő RNS-ek (pre-messenger RNS, pre-mRNS) nem kódoló (intron) szakaszainak eltávolítását végzik (Villa et al., 2002). Az U7 snRNP a hiszton mRNS-ek 3' végének kialakulását, míg az RNáz P endoribonukleáz a transzfer RNS-ek (tRNS-ek) 5' végének érését irányítja (Yu et al., 1999). A telomeráz RNP a kromoszóma végeken lévő telomer régió szintézisét végzi, és fontos szerepet játszik a rákos folyamatok kialakulásában (Collins and Mitchell, 2000). A szintén nagy kópiaszámban előforduló 7SK RNS a P-TEFb transzkripció elongációs faktor aktivitásának szabályozását végzi (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001) .

A nukleóluszban legalább 200 különféle nukleoláris kis RNS (snoRNS) található, melyeket evolúciósan konzervált szekvencia motívumaik és másodlagos szerkezetük alapján két családba sorolhatunk (Balakin et al., 1996; Ganot et al., 1997b). Legtöbbjük a riboszómális RNS-ek (rRNS) meghatározott nukleotidjainak poszt-transzkripciós módosításához szükséges. Az eukarióta rRNS-ek és szplájszoszómális snRNS-ek több mint kétszáz poszt-transzkripciósan szintetizált pszeudouridint és 2'-*O*-ribóz-metilált nukleotidot tartalmaznak. A box C/D

nukleoláris kis RNS-ek a cél (target) nukleotidok 2'-*O*-ribóz-metilációját (Kiss-László et al., 1996), míg a box H/ACA snoRNS-ek meghatározott uridinek pszeudouridinné történő izomerizációját irányítják (Bortolin et al., 1999; Ganot et al. 1997a; Ni et al., 1997). Emellett az RNS polimeráz III (pol III) által szintetizált U6 snRNS ribóz-metilációját is box C/D snoRNS-ek végzik (Ganot et al., 1999; Tycowski et al., 1998). A módosított nukleotidok szintézisét irányító snRNS–ek egy nemrégiben felfedezett új osztálya kizárólag a nukleoplazmában található Cajal testben (korábban coiled body) halmozódik fel és az RNS polimeráz II által átírt szplájszoszómális snRNS-ek ribóz-metilációját és pszeudouridilációját végzi. Ezen RNS család tagjait lokalizációjuknak megfelelően scaRNS-eknek (small Cajal-body specific RNA) nevezzük. Szerkezetileg a scaRNS-ek sok esetben box C/D és box H/ACA snoRNS-szerű doménekből épülnek fel. Módosított nukleotidok különösen abundánsak az RNS-ek evolúciósan konzervált, funkcionális régióiban és számos esetben nélkülözhetetlenek az RNS funkciójához.

Box C/D vagy box H/ACA szerkezeti elemek ugyanakkor nem csak nukleotidok módosítást irányító RNS molekulákban fordulnak elő. Számos box H/ACA (pl. snR30/U17) ill. box C/D (pl. U3) snoRNS az rRNS-ek éréséhez szükséges meghatározott nukleolítikus hasítások kivitelezésében játszik szerepet. A kromoszóma végek szintéziséhez szükséges telomeráz RNS (hTR) 3' vége is egy esszenciális box H/ACA scaRNS-szerű domént hordoz.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám fő célkitűzése az emberi sejtekben előforduló, eddig ismeretlen sejtmagi kis RNS-ek azonosítása és jellemzése. Miközben a nagy genom-programok rendkívül hatásosak a fehérjéket kódoló gének azonosításában, természetükből adódóan az snRNS-ek génjeinek meghatározása sokkal bonyolultabb feladat. A nem kódoló RNS-ek szekvencia konzerváltsága igen kis mértékű, ill. sok esetben csak a másodlagos szerkezet konzerváltsága jellemző. Az RNS gének nem tartalmaznak „olvasási keretet" (open reading frame, ORF), és a poli(A) farok hiánya következtében nem fordulnak elő az EST (expressed sequence tag) könyvtárakban sem. Statisztikailag lényegesen kevesebb információt hordoznak, mint a fehérje kódoló gének így számítógépes azonosításuk is nehézkes. Ugyanakkor az snRNS-eket nagy számban tartalmazó cDNS könyvtárak szisztematikus szekvencia analízise már sok esetben bizonyította hatékonyságát olyan új snRNS-ek azonosításában is, melyek nem mutattak semmiféle szerkezeti hasonlóságot korábban már ismert RNS-sekkel (Kiss-László et al., 1996; Ganot et al., 1997a; Huttenhofer et al., 2001)

Míg a tRNS-ekben előforduló nagyszámú módosított nukleotid szintézisét fehérje enzimek végzik, az eukarióta rRNS-ekben és szplájszoszómális snRNS-ekben előforduló két leggyakoribb nukleotid módosításért (a ribóz-2-O-metilációjáért és az uridinek pszeudouridinekké történő izomerizációjáért) sejtmagi ribonukleoproteinek két eltérő családja felelős. Mindazonáltal, míg az RNS polimeráz II által szintetizált U1, U2, U4 és U5 snRNS-ek összesen 21 pszeudouridint és 13 ribóz-metilált nukleotidot tartalmaznak, munkánk kezdetekor csupán egyetlen módosítást irányító snRNP volt ismert. Munkánk célja az volt, hogy felderítsük milyen mértékben vesznek részt snRNP-k a szplájszoszómális snRNS-ekben történő nukletid módosítási folyamatokban.

A riboszómális RNS-ek és az RNS polimeráz III által átírt U6 snRNS érési és nukleotid módosítási folyamatai a sejtmagon belül a nukleóluszban történnek. Munkánk során megvizsgáltuk, a sejt mely kompartmentjében történik az RNS polimeráz II-specifikus snRNS-ek nukleotid módosítása.

Az emlős rRNS-ek és snRNS-ek több mint száz pszeudouridint hordoznak. Ugyanakkor csak korlátozott számú olyan humán box H/ACA snRNS volt ismert, mely ezen folyamatokban vett részt; továbbá a box H/ACA szerkezeti domén jelen van olyan létfontosságú snRNS-ekben is melyek nem pszeudouridin szintézist irányítanak. Célunk a humán sejtekben előforduló box H/ACA snRNS-ek szisztematikus azonosítása volt, hogy teljesebb képet kapjunk a pszeudouridin szintézist végző molekuláris folyamatokról.

EREDMÉNYEK

1. KÖZLEMÉNY : EGY ÚJ RNS CSALÁD FELFEDEZÉSE : A CAJAL TEST-SPECIFIKUS NUKLEÁRIS KIS RNS-EK (SCARNS).

Humán snRNS-ekből készített cDNS könyvtár analízise során azonosítottunk hét új snRNS-t melyek funkcionálisan egy új osztályba sorolhatóak. Az új RNS-ek a nukleoplazmában található Cajal testben halmozódnak fel és az RNS polimeráz II által átírt szplájszoszómális snRNS-ek ribóz-metilációját és pszeudouridilációját végzik (Darzacq et al., 2002). Szerkezetileg az új snRNS-ek a box H/ACA, a box C/D vagy a nemrégiben felfedezett box C/D-H/ACA kiméra snRNS családba tartoznak. Eredményeink hozzájárultak annak felismeréséhez, hogy a

Cajal-test a szplájszoszómális snRNS-ek poszttranszkripciós nukleotid módosításaiban vesz részt.

2. KÖZLEMÉNY: EGY SZOKATLAN SZERKEZETŰ PSZEUDOURIDILÁCIÓT IRÁNYÍTÓ ÚJ CAJAL TEST-SPECIFIKUS NUKLEÁRIS KIS RNS AZONOSÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE: AZ U93 BOX H/ACA-H/ACA SCARNS.

A cDNS könyvtárunk vizsgálata során azonosítottunk egy szokatlan szerkezetű nukláris kis RNS-t, mely két box H/ACA RNS-szerű doménből épül fel. Az U93 snRNS a szplájszoszómális U2 snRNS egy konzervált pszeudouridinjének szintézisét irányítja. *In situ* hibridizációs kísérletek igazolták, hogy az U93 snRNS is a Cajal-testben található. Mutációs kísérletekkel megállapítottuk, hogy az U93 snRNS minden szerkezeti doménje szükséges a teljes RNS stabilitásához, noha mind az 5', mind a 3' régió képes egymástól függetlenül akkumulálódni a sejtmagi Cajal-testben.

3. KÖZLEMÉNY PSZEUDOURIDILÁCIÓT IRÁNYÍTÓ HUMÁN BOX H/ACA SNRNS-EK SZISZTEMATIKUS AZONOSÍTÁSA: 63 ÚJ, NUKLEOTID MÓDOSÍTÁST VÉGZŐ SNRNS AZONOSÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE

Humán box H/ACA snRNS-ek cDNS könyvtárának vizsgálata során azonosítottunk 61 korábban ismeretlen box H/ACA snRNS-t és két box C/D snRNS-t. Várakozásunknak megfelelően az új RNS-ek legtöbbje a riboszómális és szplájszoszómális RNS-ek pszeudouridin szintézisében vesz részt. Jelenleg a riboszómális és szplájszoszómális RNS-ekben található pszeudouridilációs helyek több mint 80 %-ához tudunk box H/ACA snRNS-t rendelni. Néhány új snRNS azonosítása korábban még nem ismert pszeudouridilációs helyet jelzett, melyek meglétét kísérletesen bizonyítottuk.

Azonosítottunk 12 új box H/ACA snRNS-t is melyek funkciója nem ismert. Munkánk során megvizsgáltuk az új snRNS-ek genomi elhelyezkedését is. Minden eddig ismert és újonnan azonosított nukleotid módosítást irányító box H/ACA snRNS más gének introni régiójában helyezkedik el. A „gazda" gének legtöbbje riboszómális fehérjét vagy a riboszóma érésében szerepet játszó fehérjét kódol, ill. nagy számban fordultak elő olyan gének is, melyek terméke a genom szerkezetének biztosításában vesz részt. Számos gén nem rendelkezett fehérje kódoló

kapacitással, ezen gének puszta feladata a bennük található snRNS gének kifejeződésének biztosítása.

IRODALOM

1. Eddy, S.R. (2001). *Nat. Rev. Gen.*,**2**, 919-929.
2. Yu, Y.T., Scharl, E.C., C.M., S. and Steitz, J.A. (1999). In R.F., G., T.R., C. and J.F., A. (eds.), *The RNA World*. CSHP, Cold Spring Harbor, New York, pp. 487-524.
3. Villa, T., Pleiss, J.A. and Guthrie, C. (2002). *Cell*, **109**, 149-152
4. King, T.H., Liu, B., McCully, R.R. and Fournier, M.J. (2003). *Molecular Cell*, **11**, 425-435.
5. Balakin, A.G., Smith, L. and Fournier, M.J. (1996) *Cell*, **86**, 823-834.
6. Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M. and Kiss, T. (1996). *Cell*, **85**, 1077-1088.
7. Ganot, P., Bortolin, M.L. and Kiss, T. (1997a). *Cell*, **89**, 799-809.
8. Ni, J., Tien, A.L. and Fournier, M.J. (1997). *Cell*, **89**, 565-573.
9. Ganot, P., Jady, B.E., Bortolin, M.L., Darzacq, X. and Kiss, T. (1999) *Mol Cell Biol*, **19**, 6906-6917.
10. Tycowski, K.T., You, Z.H., Graham, P.J. and Steitz, J.A. (1998) *Mol Cell*, **2**, 629-638.
11. Jady, B.E. and Kiss, T. (2001) *Embo J*, **20**, 541-551
12. Darzacq, X., Jady, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E. and Kiss, T. (2002). *Embo J*, **21**, 2746-2756.
13. Kiss, A.M., Jady, B.E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E. and Kiss, T. (2002). *Nucleic Acids Res*, **30**, 4643-4649
14. Mitchell, J.R., Cheng, J. and Collins, K. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 567-576.
15. Jady, B. E., Bertrand, E., and Kiss, T. (2004). *J Cell Biol*, **164**(5), 647-652.
16. Bortolin, M.L., Ganot, P. and Kiss, T. (1999) *Embo J*, **18**, 457-469.
17. Huttenhofer, A., Kiefmann, M., Meier-Ewert, S., O'Brien, J., Lehrach, H., Bachellerie, J.P. and Brosius, J. (2001) *Embo J*, **20**, 2943-2953.
18. Ofengand, J. and Fournier, M.J. (1998). In *Modification and Editing of RNA*, Grosjean, H. and Benne, R. eds.(Washington, DC: AMS Press), pp. 229-253.
19. Carmo-Fonseca M., (2002). *EMBO Rep*. 3(8): 726-727.
20. Gall, J.G. (2003). *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Dec;4(12):975-80.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

1. DARZACQ X., JÁDY B.E., VERHEGGEN C., KISS A. M., BERTRAND E. AND KISS T. **CAJAL BODY-SPECIFIC SMALL NUCLEAR RNAS: A NOVEL CLASS OF 2'-O-METHYLATION AND PSEUDOURIDILATION GUIDE RNAS.** *EMBO J.*, 21, 2746-2756, 2002. [IMPACT FACTOR: 10.698, IDÉZETEK SZÁMA: 70]

2. KISS A.M., JÁDY B.E., DARZACQ X., VERHEGGEN C., BERTRAND E. AND KISS T. **A CAJAL BODY-SPECIFIC PSEUDOURIDYLATION GUIDE RNA IS COMPOSED OF TWO BOX H/ACA SNORNA-LIKE DOMAINS.** *NUCL ACID RES*, 30, (21) 4643-4649, 2002. [IMPACT FACTOR: 7.051, IDÉZETEK SZÁMA: 16]

3. KISS A.M., JÁDY B.E., BERTRAND E. AND KISS T. **THE HUMAN BOX H/ACA PSEUDOURIDYLATION GUIDE RNA MACHINERY.** *MOL CELL BIOL.*,(13), 5797-5807, 2004 . [IMPACT FACTOR: 8.840, IDÉZETEK SZÁMA: 4]

ÖSSZESÍTETT IMPACT FACTOR: 28.932, IDÉZETEK SZÁMA: 90.