



Doctoral Thesis

Identification of novel RNA-binding proteins and their RNA targets

Author(s):

Scherrer, Tanja

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006042499> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 18804

**IDENTIFICATION OF NOVEL RNA-BINDING PROTEINS
AND THEIR RNA TARGETS**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
TANJA SCHERRER
Dipl. Mikrobiol., University of Zurich

Born July 26, 1980

Citizen of Alt St. Johann SG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Detmar
Prof. Dr. Markus Aebi
Dr. André Gerber

2010

1 Summary

1.1 Summary

RNA-binding proteins (RBPs) participate in various steps of gene regulation, including RNA processing, export, localization, degradation, and translational control. There are around 600 annotated and predicted RBPs in the *Saccharomyces cerevisiae* genome, and they often contain a characteristic RNA-binding motif. However, some RBPs lack such distinctive motifs and would thus be missed by bioinformatic approaches. Therefore, we set up a screen to detect such proteins experimentally. Using protein microarrays probed with different types of RNA, we found almost 200 proteins able to bind RNA *in vitro*. Surprisingly, more than 40% of them are enzymes with yet unexpected RNA-binding activity which may represent, therefore, dual function enzymes. We systematically identified the RNA targets of 14 proteins with yet unknown RNA-binding activity, twelve of them being enzymes. Nine of these proteins were preferentially associated with RNAs coding for functionally or cytotopically related proteins acting in interconnected cellular pathways. Four of these were allied with their own mRNA, suggesting the presence of widespread post-transcriptional feedback regulation. For one of these potential novel RBPs, the methionine aminopeptidase Map1p, which was preferentially associated with messages encoding ribosomal, mitochondrial, and glycolytic proteins, we found that transcript levels of these Map1p targets were selectively decreased upon Map1p overexpression. This suggests a yet unknown function of this enzyme in the

regulation of gene expression. Based on these results, we propose post-transcriptional regulatory roles for a variety of metabolic enzymes via binding to mRNAs encoding proteins involved in related pathways, or via autoregulatory feedback loops.

To address a potential involvement of novel RBPs in disease, we have further characterized the zinc finger protein Gis2p and its human homolog ZNF9. The function of the yeast ortholog is yet unknown, whereas the human ZNF9 has been reported to bind to DNA and RNA, and mutations in *ZNF9* cause the neuromuscular disease myotonic dystrophy type 2 (DM2). To better understand the functions of these proteins, we have undertaken a systematic analysis of the RNA targets and of the global implications of Gis2p for gene expression. Almost 1,000 different mRNAs were associated with Gis2p, most of them coding for RNA processing factors, chromatin modifiers, and GTPases. Target mRNAs contained stretches of G(A/U)(A/U) trinucleotide repeats located in the coding sequences that are sufficient for binding to both Gis2p and ZNF9, thus implying extensive structural conservation. The predicted human mRNA targets belong to the same functional categories as found among yeast targets, suggesting also strong functional conservation, which is supported by the complementation of the large cell-size phenotype of *gis2* mutants with *ZNF9*. Additionally, ZNF9 binds mRNAs encoding proteins involved in muscle contraction such as myosins, troponins and ion channels. We finally applied a matched-sample proteome-transcriptome analysis showing that Gis2p coordinates expression of its targets, primarily by reducing mRNA and protein levels of genes required for ribosome assembly and by selectively upregulating protein levels of myosins. Hence, our work defines RNA regulons coordinated by these conserved RNA-binding proteins, suggesting that ZNF9 may control the expression of genes important for

muscle function and thus, may impinge on future studies on the pathogenesis of DM2 and its therapy.

1.2 Zusammenfassung

RNA-Bindungsproteine (RBPs) sind an diversen Stufen der Genregulation beteiligt, was RNA-Prozessierung, -Export, -Lokalisierung, -Abbau und Translationskontrolle beinhaltet. Es gibt rund 600 verifizierte und vorausgesagte RBPs im Genom von *Saccharomyces cerevisiae*, welche oft ein charakteristisches RNA-Bindungsmotif enthalten. Allerdings fehlen einigen RBPs solch markante Motive, und sie würden deshalb kaum mit bioinformatischen Methoden erkannt werden. Um solche RBPs experimentell zu detektieren, haben wir ein unvoreingenommenes Screening durchgeführt. Durch den Gebrauch von Protein-Microarrays, welche mit RNA hybridisiert wurden, fanden wir fast 200 Proteine, welche *in vitro* RNA binden. Überraschenderweise sind mehr als 40% von ihnen Enzyme mit bisher unentdeckter RNA-Bindungsaktivität, welche somit wahrscheinlich Enzyme mit Doppelfunktion darstellen. Von 14 dieser bisher unbekanntem RBPs, wovon zwölf Enzyme sind, haben wir systematisch die assoziierten RNA-Moleküle bestimmt. Neun von ihnen waren mit RNAs assoziiert, welche für funktionell verwandte Proteine aus zusammenhängenden zellulären Pathways kodieren. Vier von jenen Proteinen haben ihre eigenen mRNAs gebunden, was auf das Vorhandensein von weit verbreiteten post-transkriptionellen Rückkopplungs-Kontrollmechanismen schliessen lässt. Für eines dieser neuartigen potenziellen RBPs, die Methionin-Aminopeptidase Map1p, welche vor allem mit Transkripten kodierend für ribosomale, mitochondriale und glykolytische Proteine assoziiert war, fanden wir eine spezifische Reduzierung seiner assoziierten RNAs infolge einer Map1p Überexpression. Dies weist auf eine bisher unerkannte Beteiligung dieses

Enzyms in der Genregulation hin. Basierend auf diesen Daten postulieren wir regulatorische Aufgaben für eine Vielzahl von Enzymen auf post-transkriptioneller Ebene, entweder durch Bindung von mRNAs, die funktionell verwandte Proteine kodieren, oder über autoregulatorische Rückkopplungs-Schleifen.

Um eine mögliche Beteiligung dieser neuartigen RBPs in der Krankheitsentstehung zu erforschen, haben wir zudem das Zink-Finger Protein Gis2p und sein menschliches Homolog ZNF9 genauer charakterisiert. Die Funktion des Hefe Orthologs ist unbekannt, währenddessen das menschliche ZNF9 ausgewiesene DNA- und RNA-Bindungsaktivität besitzt und zudem Mutationen in *ZNF9* zur neuromuskulären Krankheit myotonische Dystrophie Typ 2 (DM2) führen. Zum besseren Verständnis der Funktion dieser verwandten Proteine haben wir eine systematische Analyse der RNA-Assoziationen von Gis2p und seiner globalen Auswirkungen für die Genexpression durchgeführt. Fast 1'000 verschiedene mRNAs waren mit Gis2p assoziiert, welche hauptsächlich für RNA-Prozessierungsfaktoren, Chromatin-Modifikatoren und GTPasen kodieren. Diese mRNAs enthalten überproportional viele G (A / U) (A / U) Trinukleotid-Abfolgen in ihren kodierenden Sequenzen, welche für die Bindung von sowohl Gis2p als auch ZNF9 entscheidend sind, was eine umfassende strukturelle Konservierung dieser Proteine impliziert. Menschliche mRNAs mit solchen Trinukleotid-Abfolgen gehören zu den gleichen funktionalen Kategorien wie die mit Gis2p assoziierten Hefe mRNAs, was darauf hindeutet, dass Gis2p und ZNF9 auch stark funktionell konserviert sind. Dies wird bestätigt durch die Komplementation des Phänotyps von *gis2* Mutanten, welcher sich durch übergrösse Zellen auszeichnet, mit ZNF9. Darüber hinaus bindet ZNF9 mRNAs die für Proteine kodieren, welche in der Muskelkontraktion eine Rolle spielen, wie

beispielsweise Myosine, Troponine und Ionenkanäle. Eine matched-sample Transkriptom-Proteom-Analyse machte schliesslich deutlich, dass Gis2p die Expression seiner assoziierten mRNAs koordiniert; dies vor allem durch die Verringerung von mRNA- und Proteinmengen von Genen, die für die Ribosombiosynthese zuständig sind, und durch die selektive Erhöhung von Myosin-Proteinmengen. Unsere Arbeit identifiziert somit die RNA Regulons von diesen beiden stark konservierten RBP Orthologen, was darauf schliessen lässt, dass ZNF9 die Expression von Genen kontrolliert, welche wichtig für die Muskelfunktion sind. Diese Erkenntnis wird wahrscheinlich künftige Studien über die Pathogenese von DM2 wie auch deren Therapie beeinträchtigen.