



Doctoral Thesis

## The Mpn1 RNA Exonuclease: Cellular Functions and Implication in Disease

**Author(s):**

Shchepachev, Vadim

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010150212> →

**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](#).

# **The Mpn1 RNA Exonuclease: Cellular Functions and Implication in Disease**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Vadim Shchepachev**

Master of Science in Biology, Saint-Petersburg State University, Russian Federation  
Born January 12<sup>th</sup>, 1985  
Citizen of Russian Federation

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Claus Azzalin, examiner  
Dr. Marc Bühler, co-examiner  
Prof. Dr. Vikram Panse, co-examiner

# Abstract

The flow of information from DNA to proteins is governed by two macro-molecular ribozymes: the spliceosome and the ribosome. The spliceosome is a multisubunit machine found in all eukaryotes, which searches transcripts for a class of intervening sequences named introns in order to splice them out of the message. Alternative splicing allows several transcripts to be obtained from one single gene, thus greatly diversifying the coding potential of eukaryotic genomes. 5 spliceosomal small nuclear RNAs (snRNAs) comprise the building blocks of the spliceosome, with U6 snRNA playing the central catalytic role. Spliceosomes are highly dynamic complexes, assembled anew on every intron from a snRNA pool and protein cofactors. Upon completion of splicing the spliceosome is disassembled and the components can be recycled in new spliceosomes.

The path of U6 snRNA towards an assembling spliceosome starts with transcription by the RNA polymerase III machinery. U6 snRNA undergoes a number of maturation steps, one of them being the addition of nontemplated uridines to its 3' terminus by the U6-specific TUTase enzyme. TUTase generates poly(U) tracts terminating with 2',3'-cis-diol groups, however the predominant form of U6 snRNA in various model organisms bears a 3' terminal tract with 5 uridines blocked by a 2',3'-cyclic phosphate group. *In vivo* the 3' terminus of mature U6 snRNA is bound by the conserved Lsm2-8 complex. While the existence of activities that trim the poly(U) tract of U6 snRNA and that convert the 2',3'-cis-diol into 2',3'-cyclic phosphate have been known to exist for long time, the identity of the polypeptides that bear this activity has remain unknown. We have now shown that Mpn1, a conserved member of the 2H superfamily of phosphodiesterases, exerts both activities in fission yeasts and in humans. The MPN1 gene is mutated in all patients diagnosed with a rare genodermatosis known as Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia. Both in yeasts and humans Mpn1-deficient cells accumulate U6 snRNA species carrying aberrantly extended uridine tracts terminated with adenine residues. Furthermore, U6 snRNA stability was compromised and U6-Lsm complex formation was severely diminished in mpn1 mutants. We also demonstrated that Rrp6 exonuclease promotes U6 degradation in Mpn1-deficient cells and that, at least in human cells, U6 snRNA is not the only substrate for Mpn1. Our data represent the first step towards the

understanding of the molecular role of Mpn1 in living cells, offering a framework for the development of therapeutic approaches to cure poikiloderma with neutropenia.

# Zusammenfassung

Der Informationsfluss von DNA zu Proteinen wird durch zwei makromolekulare Ribozyme reguliert: durch das Spliceosom und das Ribosom. Das in allen Eukaryoten vorkommende Spliceosom, eine Maschinerie aus mehreren Komponenten, scannt RNA-Transkripte nach einer Klasse von eingelagerten Sequenzen, sogenannte Introns, um diese dann aus der RNA herauszuschneiden. Alternatives Splicing erlaubt es, dass eine Vielzahl von Transkripten aus einem einzelnen Gen produziert werden können und ermöglicht somit eine massive Vervielfältigung des Kodierungspotenzials von eukaroytischen Genomen. Fünf spliceosomale kleine, nukleäre RNA (snRNA) Spezies bilden zusammen das Grundgerüst des Spliceosoms, mit der U6 snRNA in einer zentralen katalytischen Funktion. Spliceosome sind sehr dynamische Komplexe, die auf jedem Intron neu gebildet werden aus der Menge von freien snRNAs und Protein-Cofaktoren. Mit der Beendigung der Splicing-Reaktion wird das Spliceosom zerlegt und die Bestandteile in neue Spliceosome rezykliert.

U6 snRNA wird durch die RNA Polymerase III Maschinerie transkribiert und untergeht dann eine Reihe von Reifungsschritten, einer davon ist das Anfügen von nicht-kodierten Uridinen an das 3' Ende durch das U6 spezifische TUTase Enzym. TUTase generiert Poly(U) Stränge, die mit einer 2',3'-cis-diol Gruppe enden. Die U6 snRNA endet jedoch in verschiedenen Modelorganismen am häufigsten in einem 3' Poly(U) Strang aus 5 Uridinen mit einer 2',3'-zyklischen Phosphatgruppe. *In vivo* ist das 3' Ende von reifer U6 snRNA durch den konservierten Lsm2-8 Komplex gebunden. Die Existenz von Aktivitäten, die den Poly(U) Strang von U6 snRNA kürzen und das 2',3'-cis-diol in ein 2',3'-zyklisches Phosphat umwandeln, war schon lange Zeit bekannt, jedoch kannte man die Identität des verantwortlichen Polypeptides nicht. Wir konnten jetzt zeigen, dass Mpn1, ein konserviertes Mitglied der 2H Superfamilie von Phosphodiesterasen, diese Aufgaben in Menschen und Spaltheften übernimmt. Das MPN1 Gen ist in allen Patienten einer seltenen Genodermatose, Clericuzio-typ Poikilodermie mit Neutropenie mutiert. Sowohl in Hefen als auch bei Menschen akkumulieren in Zellen ohne Mpn1 U6 snRNA Spezies mit unnatürlich langen Uridin-Strängen, die in Adeninen enden. Weiter ist in Zellen ohne Mpn1 die U6 snRNA Stabilität vermindert und die U6-Lsm Komplexbildung massiv reduziert. Wir konnten auch

zeigen, dass die Rrp6 Exonuklease in Mpn1-negativen Zellen den Abbau von U6 fördert und dass in menschlichen Zellen die U6 snRNA nicht das einzige Substrat von Mpn1 ist.

Unsere Ergebnisse bilden den ersten Schritt zum Verständnis der molekularen Rolle von Mpn1 und bieten einen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapien zur Heilung von Poikilodermie mit Neutropenie.