

DISS. ETH NO. 16722

Investigations into RNA export and NPC biogenesis

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

STEPHAN GÜTTINGER
Dipl. Natw. ETH

born 12.10.1977
citizen of Horgen, ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Ulrike Kutay, examiner
Prof. Elsebet Lund, co-examiner
Dr. Daniel Gerlich, co-examiner

2006

Summary

Part I

Nucleo-cytoplasmic transport of proteins is mainly mediated by Imp β -like transport receptors. Cargo binding by these transport receptors is controlled by the small GTPase Ran in a compartment specific manner. Nuclear export of messenger RNAs (mRNAs) depends primarily on members of the family of nuclear export factors (NXF). Interestingly, the Imp β -like transport receptor TRN2, which is 84% identical to the well-characterized import receptor TRN1, has been reported to mediate nuclear export of a subset of mRNAs via the RNA-binding protein HuR.

In the first part of this thesis, the putative export receptor TRN2 was characterized in more detail. Pull-down experiments from HeLa cell extract were performed to compare potential *in vivo* binding partners of TRN2 and TRN1. Surprisingly, it was demonstrated that both TRN2 and TRN1 bind to a similar set of RNA-binding proteins in a RanGTP-sensitive manner, indicating that these transport receptors might function in redundant import pathways. Indeed, TRN2 was shown to bind the putative export cargo HuR directly in a RanGTP-sensitive manner. Furthermore, using the RanGAP assay, TRN2 was shown to have a high affinity for RanGTP, a characteristic feature of import receptors. To verify a potential function of TRN2 in nuclear import, *in vitro* transport assays using semi-permeabilized cells were performed. As expected from the binding experiments and the RanGAP assays, both TRN2 and TRN1 were shown to mediate nuclear import of HuR *in vitro*. In summary, these data demonstrate that TRN2 is a bona fide import receptor and that both TRN2 and TRN1 function in redundant import pathways.

In the second study presented in part I, the nuclear export of precursor-miRNAs (pre-miRNAs) was investigated. In contrast to mRNA, the export of small non-coding RNAs is mediated by Imp β -like transport receptors. miRNAs, which constitute a growing class of small regulatory RNAs, are transcribed as long primary-miRNAs that are processed in the nucleus by the RNase III Droscha to pre-miRNAs. These pre-miRNAs fold into a stem-loop structure with a 2 nucleotide 3'-overhang and have to be exported to the cytoplasm, where they are further processed by the RNase III Dicer to yield mature miRNA. At the time when this study was initiated, the export receptor of pre-miRNAs was not known.

In this study, it was demonstrated that the Imp β -like transport receptor Exp5 mediates nuclear export of pre-miRNAs. It was shown that pre-miRNAs are efficiently exported from *Xenopus* oocyte nuclei in a RanGTP-dependent manner. Using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) it was demonstrated that Exp5, but not CRM1 or Exp-t, binds directly to pre-miRNAs. To analyze this interaction in more detail, competition experiments combined with EMSA were performed. These experiments demonstrated that Exp5 binds efficiently to correctly processed pre-miRNAs, but not to pre-miRNAs with changed stem end structures. To gain more insight into the requirement of Exp5 for miRNA maturation in vivo, Exp5 was downregulated in HeLa cells by RNAi and levels of mature miRNAs in the cytoplasm were measured. Less mature miRNA was present in the cytoplasm of cells with reduced levels of Exp5, indicating a defect in pre-miRNA export in these cells. Summarizing, these data demonstrate that Exp5 is the nuclear export receptor of pre-miRNAs and a key component of the miRNA biogenesis pathway linking nuclear and cytoplasmic processing steps.

Part II

Nuclear pore complexes (NPCs) are composed of about 30 proteins termed Nucleoporins (Nups). Only two transmembrane Nups, POM121 and GP210, were known in higher eukaryotes at the time when this study was started. The framework of the NPC is thought to be linked to the NE membrane by transmembrane Nups, however little is known about the exact molecular nature of this link. In the study presented in the second part of this thesis, a novel vertebrate transmembrane Nup, NDC1, was characterized and its role in NPC anchoring and biogenesis was investigated.

First, we demonstrated by immunofluorescence and immunogold electron microscopy that human NDC1 (hNDC1) localizes to NPCs in HeLa cells. In order to analyze the function of vertebrate NDC1 in vivo, we depleted hNDC1 from HeLa cells by RNAi. Cells with reduced levels of hNDC1 showed abnormal nuclear morphology and reduced numbers of FG-containing nucleoporins, indicating defects in post-mitotic NPC assembly and NE formation. To gain more detailed insight into the requirement of NDC1 in NPC biogenesis, in vitro nuclear assembly assays were performed. When *Xenopus* egg extracts were depleted of NDC1, both NPC formation and membrane fusion was blocked. These effects could be reversed by the addition of purified NDC1, which demonstrated that it is required for NE and NPC formation in vitro.

To analyze whether NDC1 is involved in anchoring of the NPC to the NE membrane, combinatorial RNAi experiments targeting soluble NPC subcomplexes and hNDC1 were performed. These experiments revealed a link between hNDC1 and the Nup93 subcomplex. Indeed, downregulation of hNDC1 was found to reduce levels of different members of the Nup93 subcomplex, namely Nup53, Nup93 and Nup205, at the nuclear rim. Furthermore, hNDC1 was also demonstrated to interact with Nup53 *in vitro*. In summary, our data demonstrate, that vertebrate NDC1 is a transmembrane Nup that functions in NPC assembly and possibly also in connecting the NE membrane to the NPC.

Part III

The small GTPase Ran is known to control different mitotic processes via the regulation of Ran-binding proteins. The uncharacterized protein KIAA1387 contains a putative Ran-binding domain and, interestingly, has been implicated in regulation of mitotic progression. Its molecular function and whether it binds Ran directly is not known.

In the third part of this thesis, it was analyzed whether KIAA1387 is indeed a Ran-binding protein and how it might affect mitotic progression. By identifying interaction partners of KIAA1387 in HeLa cell extracts, I wanted to gain more detailed insight into its molecular function.

To analyze whether the putative Ran-binding domain of KIAA1387 interacts with Ran, *in vitro* binding assays were performed. These experiments demonstrated that neither the isolated putative Ran-binding domain nor full length KIAA1387 directly interact with RanGTP. Pull-down experiments from HeLa cell extracts showed that the majority of the proteins interacting with KIAA1387 are known splicing factors. However, it is currently not known whether KIAA1387 functions in splicing and whether the splicing factors are linked to the reported function of KIAA1387 in mitosis.

Summarizing, our data demonstrate that KIAA1387 is likely not a Ran-binding protein and that it mainly interacts with splicing factors.

Zusammenfassung

Teil I

Der Austausch von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma erfolgt hauptsächlich mit Hilfe von Transportrezeptoren, die zu der Familie der Imp β -ähnlichen Transportrezeptoren gehören. Die Bindung dieser Rezeptoren an Transportsubstrate wird durch die GTPase Ran reguliert. Der Export von mRNA aus dem Zellkern hingegen hängt hauptsächlich von Transportrezeptoren der NXF (nuclear export factor) Familie ab. Interessanterweise wurde berichtet, dass bestimmte mRNAs durch Transportin2 (TRN2) in Verbindung mit dem RNA-bindenden Protein HuR exportiert werden können. TRN2 ist ein Transportrezeptor der Imp β -Familie, dessen Primärsequenz zu 84% mit dem bekannten Importrezeptor Transportin1 (TRN1) identisch ist.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der vermeintliche Exportrezeptor TRN2 genauer charakterisiert. Mittels Affinitätschromatographie wurden Interaktionspartner von TRN2 und TRN1 in HeLa Zellextrakten identifiziert und verglichen. Überraschenderweise zeigten diese Experimente, dass TRN2 und TRN1 in der Abwesenheit von RanGTP praktisch mit den gleichen Proteinen interagieren. Dies wies darauf hin, dass beide Transportrezeptoren redundante Funktionen im Kerntransport haben könnten. Diese Annahme wurde bestätigt durch die Tatsache, dass TRN2 nur in der Abwesenheit von RanGTP an das vermeintliche Exportsubstrat HuR binden konnte. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass TRN2 eine sehr hohe Affinität für RanGTP aufweist, was eine typische Eigenschaft von Importrezeptoren ist. Um die mögliche Beteiligung von TRN2 am Import von Proteinen weiter zu bestätigen, wurden in vitro Transport-Experimente durchgeführt. Wie erwartet beschleunigten sowohl TRN2 als auch TRN1 die Aufnahme von HuR in die Kerne von semi-permeabilisierten Zellen. Zusammengefasst kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass TRN2 ein Importrezeptor ist und, dass TRN2 und TRN1 beide redundante Funktionen innerhalb der Zelle ausüben.

In der zweiten Studie, welche im ersten Teil dieser Arbeit präsentiert wird, wurde der Export von mikroRNA-Vorläufern (prä-miRNA) aus dem Zellkern untersucht. Im Gegensatz zur mRNA werden kleine, nicht kodierende RNA Moleküle durch Imp β -ähnliche Transportrezeptoren exportiert. MikroRNAs (miRNAs) gehören zu einer stetig wachsenden Gruppe von RNAs, welche die Genexpression regulieren können. Sie werden als "primäre" miRNAs transkribiert, welche dann durch das nukleäre Enzym Drosha zu prä-miRNAs prozessiert werden. Diese prä-miRNAs nehmen eine Haarnadel-ähnliche Struktur ein und

besitzen am 3'-Ende des doppelsträngigen Stammes einen Überhang von 2 Nukleotiden. Die prä-miRNAs werden anschliessend durch einen bislang unbekanntem Transportrezeptor in das Zytoplasma exportiert, wo sie durch das Enzym Dicer zu der finalen miRNA prozessiert werden.

In dieser Arbeit wurde bewiesen, dass prä-miRNAs durch den Imp β -ähnlichen Transportrezeptor Exportin-5 (Exp5) aus dem Zellkern exportiert werden. Es wurde gezeigt, dass prä-miRNAs nur in Abhängigkeit von RanGTP aus den Kernen von *Xenopus* Oozyten exportiert werden, was darauf hinwies, dass ein Imp β -ähnlicher Transportrezeptor den Export von prä-miRNAs reguliert. Durch Komplexbildungsexperimente konnte demonstriert werden, dass Exp5 direkt an prä-miRNA binden kann, während für CRM1 und Exp-t keine Bindung nachgewiesen werden konnte. Weiter konnte gezeigt werden, dass Exp5 nur solche prä-miRNAs effizient binden kann, die ein natürlich geschnittenes Ende mit einem 3'-Überhang aufweisen. Um zu untersuchen, ob Exp5 in vivo für die Biogenese von miRNAs benötigt wird, wurden die Mengen an Exp5 in HeLa Zellen mittels RNA Interferenz (RNAi) reduziert und die Auswirkungen dieser Reduktion auf die Mengen an miRNAs im Zytoplasma bestimmt. In den behandelten Zellen konnte weniger miRNA im Zytoplasma nachgewiesen werden, was auf einen verminderten Export von prä-miRNAs hinwies. Zusammengefasst kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass Exp5 ein Exportrezeptor für prä-miRNAs ist und eine zentrale Funktion in der Biogenese von miRNAs besitzt.

Teil II

Kernporen sind aus ungefähr 30 verschiedenen Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (Nups), aufgebaut. Als diese Studie begonnen wurde, waren in höheren Eukaryonten nur zwei membranständige Nups bekannt, POM121 und GP210. Das Grundgerüst der Kernporen besteht hauptsächlich aus löslichen Nups, und wie diese mit der Kernmembran verbunden sind, ist nicht genau bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass membranständige Nups eine zentrale Rolle in der Verankerung der Kernporen spielen. In der hier präsentierten Studie wurde das bislang unbekanntem membranständige Nup NDC1 und seine Rolle in der Verankerung und der Biogenese von Kernporen in Vertebratenzellen untersucht.

Mittels Immunfluoreszenzanalyse und Immunogold-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass hNDC1 in HeLa Zellen ein Bestandteil der Kernporen ist. Um die Funktion von NDC1 in vivo untersuchen zu können, wurden die Mengen an NDC1 in HeLa Zellen mittels RNAi verringert. In den so behandelten Zellen konnten weniger Kernporen nachgewiesen

werden, was auf Fehler in der Biogenese der Kernporen hinwies. Um diesen Effekt genauer untersuchen zu können, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, die es erlauben, in Extrakten aus *Xenopus* Eiern künstliche Kerne zu bilden. Wurde NDC1 aus den Eiextrakten depletiert, so waren sowohl die Biogenese der Kernporen als auch die Fusion der Kernmembran blockiert. Diese Effekte konnten durch die Zugabe von gereinigtem NDC1 wieder rückgängig gemacht werden, was darauf hinwies, dass NDC1 *in vitro* für die Bildung einer Kernmembran und von Kernporen benötigt wird.

Weiter wurde in dieser Studie untersucht, ob NDC1 für die Verankerung der nicht membranständigen Nukleoporene in der Kernmembran benötigt wird. Durch die kombinierte Reduktion der Mengen an NDC1 und einzelner löslicher Komponenten der Kernporen mittels RNAi konnte eine Verbindung zwischen hNDC1 und dem Nup93 Subkomplex nachgewiesen werden. Diese Verbindung konnte durch weitere RNAi Experimente bestätigt werden, die bewiesen, dass eine Reduktion von hNDC1 in HeLa Zellen auch eine Reduktion von verschiedenen Komponenten des Nup93 Subkomplexes in den Kernporen bewirkte. Diese *in vivo* Daten konnten zusätzlich durch Bindungsexperimente gefestigt werden, die zeigten, dass NDC1 *in vitro* mit Nup53 interagiert. Zusammengefasst kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass NDC1 ein membranständiges Nukleoporin ist, das eine Funktion sowohl in der Kernporenbildung als auch in der Verankerung der Kernporen in der Kernmembran hat.

Teil III

Die GTPase Ran kontrolliert mitotische Prozesse, indem sie die Funktion verschiedener Ran-bindender Proteine reguliert. Interessanterweise wurde ein uncharakterisiertes Protein (KIAA1387) identifiziert, das vermutlich mit Ran interagieren und das Fortschreiten der Mitose regulieren kann. Ob KIAA1387 direkt an Ran bindet und wie es die Mitose reguliert, ist nicht bekannt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob KIAA1387 ein Ran-bindendes Protein ist. Zudem sollten Interaktionspartner von KIAA1387 identifiziert werden, um Hinweise auf die molekulare Funktionsweise dieses Proteins zu finden.

Um die Bindung von KIAA1387 an Ran zu untersuchen, wurden *in vitro* Bindungsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass weder die vermutliche Ran-bindende Domäne noch das vollständige Protein direkt mit Ran interagieren können. Durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem KIAA1387 mit Extrakten aus HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass KIAA1387 hauptsächlich mit Proteinen interagiert, die mit dem Spleißen von mRNA in Zusammenhang stehen. Es ist im Moment nicht bekannt, ob diese

Proteine mit der Funktion von KIAA1387 während der Mitose zusammenhängen. Ferner ist noch unklar, ob KIAA1387 selbst eine Funktion im Spleissen von mRNA hat.

Aus den bisherigen Daten kann geschlossen werden, dass KIAA1387 sehr wahrscheinlich kein Ran-bindendes Protein ist und hauptsächlich mit Spleissfaktoren interagiert.