

УДК 577.241

МАЛЫЕ ЯДРЫШКОВЫЕ РНК

© 2007 г. Ю. А. Макарова*, Д. А. Крамеров

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 02.05.2006 г.

Принята к печати 13.06.2006 г.

Малые ядрышковые РНК (мякРНК) представляют собой многочисленную группу не кодирующих белок РНК. В комплексе с белками мякРНК осуществляют две самые распространенные модификации нуклеотидов в рРНК и некоторых других клеточных РНК: 2'-О-метилирование рибозы и псевдоуридилрование. мякРНК вовлечены также в разрезание пре-рРНК и функционирование теломеразы. По наличию консервативных элементов в нуклеотидной последовательности почти все мякРНК относят к одному из двух семейств: C/D или H/ACA. Хотя белки C/D- и H/ACA-мякРНК содержат гомологичные участки, процесс сборки этих мякРНК имеет существенные отличия. К мякРНК относят и РНК, входящие в состав РНКаз Р и MRP. В обзоре также обсуждаются строение и функции сходных с мякРНК малых РНК из телец Кахаля – небольших оргanelл, ассоциированных с ядрышком.

Ключевые слова: малая ядрышковая РНК, рРНК, 2'-О-метилирование РНК, псевдоуридилрование РНК, тельца Кахаля, некодирующие РНК.

SMALL NUCLEOLAR RNAs, by J. A. Makarova*, D. A. Kramerov (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia; *e-mail: makarova@eimb.ru). Small nucleolar RNAs (snoRNAs) are an abundant class of non-protein-coding RNAs. In association with proteins they perform two most frequent nucleotide modifications in rRNAs and some other cellular RNAs: 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation. SnoRNAs also participate in pre-rRNA cleavage and telomerase functions. Most snoRNAs fall into two families, box C/D and H/ACA, distinguished by the presence of conserved sequence boxes. Although C/D and H/ACA snoRNP proteins contain homologous regions, the assembly of these RNPs significantly differ. In addition, snoRNAs include the RNA component of RNases P and MRP. The structure and function of small RNPs from Cajal bodies (small organelles associated with nucleoli) similar to snoRNP are also discussed.

Key words: small nucleolar RNA, rRNA, 2'-O-methylation of RNA, pseudouridylation of RNA, Cajal bodies, noncoding RNAs.

Малые ядрышковые РНК (мякРНК, или snoRNAs – small nucleolar RNAs) впервые обнаружили в клетках млекопитающих в конце 60-х годов прошлого века, однако существенный прогресс в их изучении был достигнут только к середине 90-х благодаря появлению новых экспериментальных подходов. К настоящему времени известно более 100 видов мякРНК, и их число продолжает расти. мякРНК найдены у всех эукариот и даже у архей, где, видимо, из-за отсутствия ядрышка, они были названы sRNAs (sno-like).

мякРНК относятся к постоянно растущей группе некодирующих РНК, которые выполняют в клетке удивительно широкий набор функций.

Принятые сокращения: мякРНК – малая ядрышковая РНК (snoRNA – small nucleolar RNA); мяРНК – малая ядерная РНК (snRNA – small nuclear RNA); ТК – тельца Кахаля (СВ – Cajal bodies); макРНК – малая РНК из телец Кахаля (scaRNA – small Cajal-body specific RNA); мякРНК – малый ядрышковый рибонуклеопротеин (snoRNP – small nucleolar RNP).

*Эл. почта: makarova@eimb.ru

мякРНК локализованы в ядрышке, число их разновидностей и молекул в клетке таксоноспецифично. Например, видов мякРНК примерно в 2 раза больше у позвоночных животных, чем у дрожжей. Кроме того, клетки позвоночных содержат по 10^4 – 10^5 молекул каждого вида, а дрожжей – от 10^2 до 10^3 [1].

Почти все известные мякРНК принимают участие в процессинге рРНК. 18S, 5.8S и 25/28S рРНК транскрибируются в ядрышке в составе молекул 35/45S пре-рРНК. При созревании этот предшественник разрезается в нескольких местах, в результате чего удаляются внешние и внутренние транскрибируемые спейсеры и высвобождаются молекулы трех зрелых рРНК. Одновременно с транскрипцией начинаются модификации нуклеотидов рРНК, происходящие, за единичными исключениями [2], на стадии пре-рРНК еще до завершения транскрипции [3]. Интересно, что модификации полностью отсутствуют в

транскрибируемых спейсерах [3]. Две наиболее распространенные модификации – метилирование остатков рибозы по 2'-ОН и превращение уридина в псевдоуридин. Число модифицированных нуклеотидов в составе зрелых рРНК различно в разных таксонах: например, у позвоночных насчитывается примерно 100 участков модификаций каждого вида, а у дрожжей – около 50 [4]. Основные функции мякРНК связаны с определением сайтов модификации рРНК, а также с разрезанием пре-рРНК в ходе ее процессинга.

Несмотря на то что механизмы модификаций и строение мякРНК весьма консервативны, гены мякРНК проявляют удивительное разнообразие организации. Помимо независимо транскрибирующихся генов, встречаются гены мякРНК, расположенные в интронах других генов, гены мякРНК, формирующие кластеры, которые транскрибируются с общего промотора, а также кластеры генов мякРНК, локализованные в интронах. Интересно, что в разных таксонах встречается преимущественно один из способов организации генов мякРНК. У позвоночных мякРНК образуются из интронных последовательностей пре-мРНК, однако небольшая группа мякРНК кодируется интронами генов, не кодирующих белки.

В состав мякРНК входит ряд консервативных элементов; в соответствии с этим практически все мякРНК принадлежат к одному из двух семейств:

- первое из них, C/D-семейство (box C/D snoRNAs), к которому относятся мякРНК, содержащие консервативные последовательности C и D; большинство этих РНК вовлечено в процесс метилирования рибозы;

- второе – H/ACA-семейство (box H/ACA snoRNAs), в состав которого входят мякРНК, содержащие консервативные последовательности H и ACA; почти все РНК этого семейства направляют процесс псевдоуридилации.

К мякРНК также относится РНК, входящая в состав РНКазы MRP. В эту же группу иногда включают РНК-компонент РНКазы P.

К настоящему времени получен ряд данных о том, что нарушения экспрессии мякРНК могут иметь тяжелые последствия для организма. Так, делеция генов обнаруженных недавно мякРНК (HVI-52 и HVI-85) играет существенную, если не ведущую, роль в патогенезе синдрома Прадера-Вилли [5, 6].

C/D-СЕМЕЙСТВО мякРНК

Несколько видов РНК этого семейства (U3, U8, U14 и U22 [7]) необходимы для разрезания пре-рРНК, в ходе которого они комплементарно взаимодействуют несколькими участками с пре-рРНК, действуя как РНК-шапероны [8]. Отсут-

ствие этих мякРНК приводит к гибели клеток. В целом механизм процессинга пре-рРНК достаточно консервативен, однако его детали отличаются у организмов из разных таксонов. Так, U8 РНК, участвующая в образовании 18S рРНК, найдена у позвоночных, но не найдена у растений и дрожжей [9]. Остальные C/D-мякРНК вовлечены в метилирование рибозы по 2'-О-положению (рис. 1а): мякРНК выбирает остаток рибозы, который будет модифицирован, а связанные с ней белки осуществляют метилирование. Большинство таких гидовых мякРНК участвуют в модификации рРНК.

мякРНК C/D-семейства обычно состоят примерно из 70 н. Они содержат консервативные последовательности – боксы C (UGAUGA) и D (CUGA), которые расположены в 5'- и 3'-концевых участках мякРНК и сближены за счет шпильки, образованной концами РНК (рис. 1б). Структура, включающая боксы C, D и концевую шпильку, названа C/D-мотивом [10]. Недавно показано, что C/D-мотив устроен сложнее, он состоит из двух коротких двухцепочечных участков и расположенной между ними петли. Такая структура включает в себя обнаруженный недавно РНК-мотив, названный kink-turn, или сокращенно K-turn [11]. Этот структурный мотив часто присутствует в РНК: он неоднократно встречается в рРНК, найден в U4 мяРНК, в нескольких мРНК и в РНК РНКазы MRP. Консенсусная последовательность мотива K-turn состоит из 15 н. (рис. 2а). Первый двухцепочечный участок образован обычно двумя GC-парами, а второй начинается двумя неканоническими парами, обычно GA, и состоит из четырех пар комплементарно взаимодействующих остатков. Расположенная между ними петля всегда асимметрична и часто содержит три неспаренных нуклеотида с одной стороны и ни одного с другой. Два крайних нуклеотида петли вовлечены в стекинг с соответствующими двухцепочечными участками, а средний нуклеотид петли обращен в раствор. Два двухцепочечных участка расположены под углом 120° друг к другу. В этом мотиве нередко встречаются вариации (рис. 2б), например, замены нуклеотидов в двухцепочечных участках – комплементарные взаимодействия при этом сохраняются, может меняться и количество нуклеотидов, формирующих внутреннюю петлю: 2–4 с одной стороны и 0–1 – с другой [11].

C/D-мотив служит местом связывания белков C/D-мякРНК. Он необходим и достаточен для формирования, стабильности и ядрышковой локализации мякРНК [10], а также для гиперметилирования кепа в мякРНК, кодируемых самостоятельными генами и транскрибируемых РНК-полимеразой II [12].

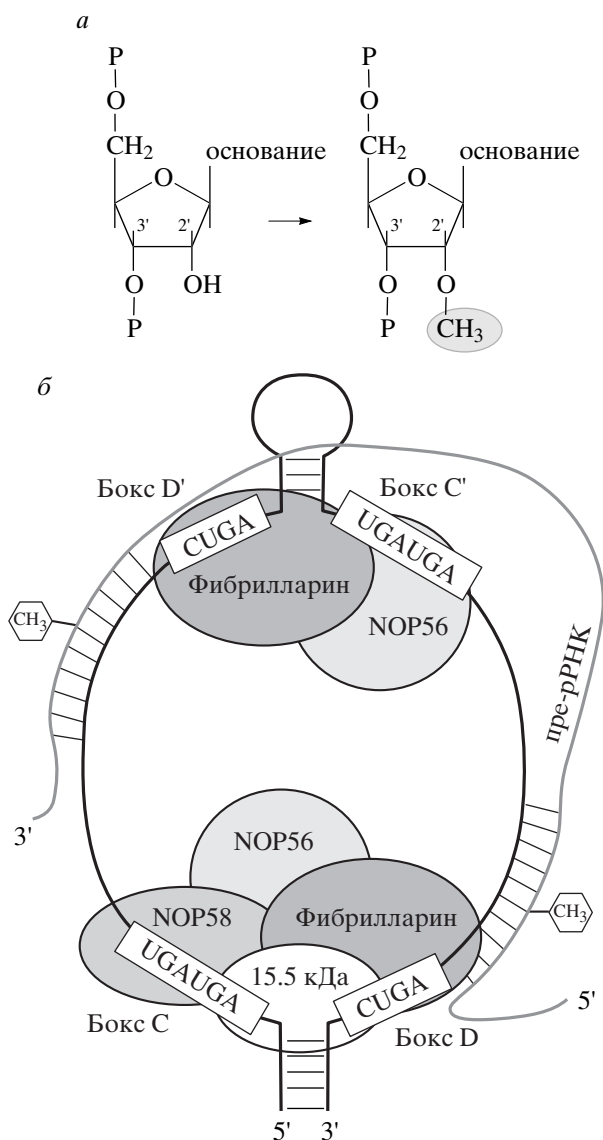


Рис. 1. мЯКРНК C/D-семейства определяют нуклеотид, который будет метилирован по 2'-ОН группе. *а* – Метилирование рибозы по 2'-ОН. *б* – Структура комплекса мЯКРНП/пре-рРНК. Показано взаимодействие антисмысловых элементов мЯКРНК с пре-рРНК (серая линия) и консервативных последовательностей мЯКРНК (боксов С, D, С' и D') с белками мЯКРНП (NOP56, NOP58, фибрилларин и белком 15.5 кДа). 2'-О-метилированию подвергается остаток рРНК, отмеченный шестиугольником и отделенный 4 н. от последовательностей D и D'. Метилтрансферазой служит белок фибрилларин.

Все C/D-РНК содержат также боксы С' и D', локализованные в центральной части молекулы. Их нуклеотидные последовательности могут быть вырожденными, причем нуклеотиды G₅, A₆ в С' и G₃, A₄ в D' наиболее консервативны. Обычно расстояние между С' и D' составляет от 3 до 9 н., если оно больше, то боксы сближены за счет образования внутримолекулярной шпильки [13]

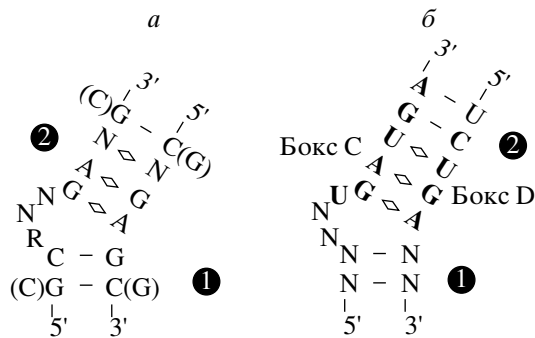


Рис. 2. Консенсусные вторичные структуры K-turn мотива (*а*) и его варианта, встречающегося в C/D-мЯКРНК (*б*). По [15] с изменениями.

(рис. 16). Консервативные последовательности мЯКРНК всегда расположены в порядке 5'-С-D'-С'-D-3'. В направлении 5'-конца от D и/или D' находятся так называемые антисмысловые элементы – участки длиной 10–21 н., полностью комплементарные соответствующим участкам рРНК и способные взаимодействовать с ними (рис. 16). Модификации подвергается остаток, входящий в такую спираль РНК/РНК и отделенный 5 н. от бокса D и/или D', что соответствует половине витка спирали [14]. С боксами С и D и/или С' и D' связывается комплекс белков, осуществляющих метилирование мЯКРНК, содержащие два антисмысловых элемента, определяют два нуклеотида, которые будут подвергнуты 2'-О-метилированию, однако чаще всего антисмысловой элемент только один.

Недавно обнаружены две мЯКРНК, содержащие по два C/D и C'/D'-мотива, т.е. фактически состоящие из двух соединенных вместе молекул мЯКРНК. Несмотря на такое сложное строение, эти мЯКРНК определяют только два сайта метилирования [16]. Теми же авторами описана еще одна мЯКРНК, содержащая не только обычные боксы С, D', С', D и антисмысловой элемент, но и расположенный перед ними дополнительный фрагмент с боксами С', D' и антисмысловым элементом. Таким образом, C/D-мотив и антисмысловой элемент служат, по-видимому, элементарной единицей, которая может быть использована в более сложных конструкциях.

2'-О-метилированные нуклеотиды содержатся не только в рРНК, но и в малых ядерных РНК (мЯРНК), участвующих в сплайсинге (U1, U2, U4–U6). К настоящему времени мЯРНК, содержащие участки, комплементарные последовательностям мЯРНК и обеспечивающие их 2'-О-метилирование, обнаружены у всех исследованных эукариот [17, 18]. Мишени ряда описанных недавно мЯРНК пока неизвестны [19–22].

мЯРНК экспрессируются во всех тканях, что соответствует ожиданиям, поскольку все клетки

содержат рибосомы, в созревание которых вовлечены мякРНК. Однако некоторые мякРНК проявляют тканевую специфичность, например, транскрибируются преимущественно или исключительно в головном мозге. Мишени именно этих мякРНК неизвестны. Вероятно, ими служат мРНК, которые также содержат модифицированные нуклеотиды. Поиск мишеней осложнен тем, что в базах данных представлено много мРНК, содержащих участки, комплементарные антисмысловым элементам мякРНК, однако из-за малой длины таких участков и большого объема баз данных эти находки статистически незначимы. Совсем недавно получены убедительные свидетельства того, что 2'-О-метилирование экспрессирующейся в головном мозге мРНК серотонинового рецептора действительно направляется мякРНК [6, 23].

С/D-мякРНК найдены даже у такого далекого от эукариот таксона, как археи [24], хотя они отсутствуют у бактерий. мякРНК архей получили название sRNAs (sno-like), однако они имеют то же строение и выполняют те же функции, что и мякРНК эукариот. Недавно было показано, что С/D-РНК архей существуют в клетках не только в линейной, но и в кольцевой форме [25], причем обе формы обнаружены в комплексе с белками, входящими в состав мякРНК. Вопрос о биологическом смысле такой организации ждет своего решения.

Н/АСА-СЕМЕЙСТВО мякРНК

Несколько видов РНК этого семейства участвуют в разрезании пре-рРНК, выполняя, как и С/D-РНК, функцию шаперонов (U17/E1/snR30, E2, E3 [26, 27] и дрожжевая РНК snR10 [7]). Почти все остальные мякРНК этого семейства направляют псевдоуридилацию рРНК [28]. Большинство видов РНК этого семейства состоят из 100–150 н. Все Н/АСА-мякРНК имеют общую вторичную структуру, включающую в себя две шпильки и два одноцепочечных участка, один из которых расположен между шпильками, а другой на 3'-конце (так называемая структура "hairpin-hinge-hairpin-tail", рис. 3а) [28]. В одноцепочечных участках у основания шпилек расположены две консервативные последовательности: первая – бокс Н, находится у основания первой шпильки, сильно вырождена и имеет консенсус ANANNA; вторая, так называемый бокс АСА, имеет консенсус АСА, расположена у основания второй шпильки и отделена 3 н. от 3'-конца мякРНК (рис. 3а). Для правильного образования концов мякРНК и формирования мякРНК необходимы оба бокса [29, 30], для ядрышковой локализации Н/АСА-мякРНК необходимы оба бокса и шпилька между ними [31], а для успешного псевдоуридилации нужны оба бокса и две шпильки [29].

В состав одной или, реже, обеих шпилек входят два участка по 3–10 н., комплементарных рРНК. В результате комплементарного взаимодействия с пре-рРНК нуклеотид, который будет модифицирован, и еще один, примыкающий к нему с 3'-конца, попадают в образующееся одноцепочечное "окно" [28] и таким образом становятся доступными для фермента, осуществляющего псевдоуридилацию (рис. 3а). В ходе реакции остаток урацила поворачивается на 180° вокруг оси N₃–C₆, при этом рвется связь C₁–N₁ и образуется новая связь C₁–C₅ (рис. 3б). Расстояние от модифицируемого нуклеотида до бокса Н и/или АСА консервативно и составляет 14–15 н. Таким образом, одни Н/АСА-мякРНК направляют псевдоуридилацию одного сайта в рРНК, а другие – двух.

Среди Н/АСА-мякРНК, как и в С/D-семействе, обнаружены РНК, обеспечивающие псевдоуридилацию мякРНК, а также мякРНК, мишени которых неизвестны [19, 22, 32]. Вероятно, этими мишенями тоже окажутся мРНК.

К настоящему времени число известных Н/АСА-РНК меньше, чем С/D-РНК. Это связано с тем, что поиск Н/АСА-РНК в базах данных нуклеотидных последовательностей затруднен из-за коротких и вырожденных характеристических последовательностей. Главным путем выявления этих РНК остается конструирование кДНК-клеток малых РНК. Следует отметить, что за последнее время в этой области достигнут значительный успех [32].

МАЛЫЕ РНК ИЗ ТЕЛЕЦ КАХАЛЯ

Недавно обнаружены необычные С/D- и Н/АСА-РНК, локализованные не в ядрышке, а в так называемых тельцах Кахалы (Cajal bodies). Тельца Кахалы (ТК), или спиральные тельца (coiled bodies), – это круглые или овальные образования диаметром 0.3–0.5 мкм, которые находятся в ядре и состоят из спиральных фибриллярных цепей, образованных, главным образом, белком коилином (p80 coilin) [33]. ТК обнаружены у позвоночных и беспозвоночных животных, а также у растений [34]. У дрожжей структура, аналогичная ТК, получила название ядрышковые тельца (nucleolar bodies) [35]. Число ТК зависит от типа клеток и видовой принадлежности организма и колеблется от 1 до 100 (обычно два–пять) [36]. Достаточно часто они ассоциированы с ядрышком, а у дрожжей находятся внутри него [35]. В составе ТК обнаружены все три РНК-полимеразы и факторы базальной транскрипции, а также мякРНК и мякРНК, но не найдены мРНК и рРНК [37]. В связи с этим полагают, что основная функция ТК – это созревание и сборка мякРНК, мякРНК и транскрипционных комплексов, которые функционируют затем в других отделах ядра [33].

локализацию макРНК в ТК [40]. Известно, что при созревании С/D-мякРНК [41] и, возможно, Н/АСА-мякРНК [42] по пути в ядрышко проходят через ТК. Поэтому обнаруженный САВ-бокс следует, видимо, рассматривать не как элемент, направляющий РНК в ТК, а как элемент, удерживающий их в ТК. Следует отметить, что С/D-мотив не обеспечивает локализацию РНК в ТК [40], поэтому пока неясно, как С/D-макРНК, имеющие только С/D-мотив и лишенные САВ-бокса, удерживаются в ТК. Очевидно, для удержания малых РНК в ТК существуют и другие механизмы, помимо связанных с САВ-боксом.

Интересно, что характерный для Н/АСА-мякРНК мотив, состоящий из двух шпилек и двух одноцепочечных участков с боксами Н и АСА, обнаружен в теломеразной РНК позвоночных [43] (рис. 5). Он расположен на 3'-конце теломеразной РНК и, например, у человека, включает в себя 240 из 451 н. теломеразной РНК. Н/АСА-мотив теломеразной РНК связан со всеми коровыми белками Н/АСА РНП [44] и необходим для стабильности теломеразной РНК, а также для функционирования теломеразы *in vivo* [43]. Кроме того, Н/АСА-мотив необходим для ядерной локализации теломеразной РНК: без него она оказывается в цитоплазме [45].

Недавно в составе этого мотива обнаружили САВ-бокс, характерный для макРНК. Благодаря этому боксу теломеразная РНК обнаруживается в ТК в клетках HeLa [47, 48], хотя некоторая часть (около 10%) локализована в ядрышке [43, 45]. Следует отметить, что теломеразная РНК присутствует в ТК только в раковых клетках и отсутствует в нормальных клетках [48]. Возможно, это связано с тем, что полноценная обратная транскриптаза имеется только в иммортализованных клетках, тогда как теломеразная РНК найдена во всех клетках. Поэтому наличие теломеразной РНК в ТК клеток HeLa может отражать то, что в этих органеллах происходит сборка теломеразы или она накапливается в них в неактивном состоянии. В пользу такого предположения свидетельствует и локализация обратной транскриптазы в ядрышке, с которым обычно тесно связаны ТК [49].

РНКаза Р и РНКаза MRP: ЭНДОНУКЛЕАЗЫ, СОДЕРЖАЩИЕ РНК

РНКаза Р

Эта РНКаза найдена у всех живых организмов, имеющих клеточное строение: эукариот, бактерий и архей. У эукариот она локализована в нуклеоплазме и в меньшем количестве в ядрышке, кроме того, активность РНказы Р обнаружена в митохондриях и хлоропластах. РНКаза Р вовлечена в удаление 5'-концевой лидерной последова-

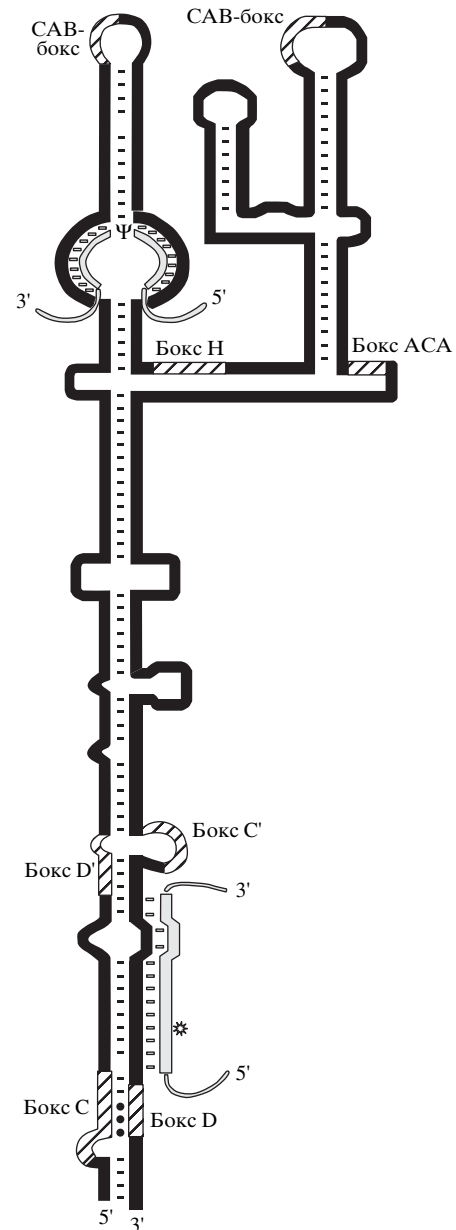


Рис. 4. Строение химерной макРНК. Приведена вторичная структура макРНК U85, предложенная в работах [15, 39]. Серым показаны комплементарные взаимодействия между мякРНК U5 и антисмысловыми элементами макРНК U85. Звездочкой отмечен 2'-О-метилированный нуклеотид. Консервативные элементы U85 РНК заштрихованы.

тельности у пре-тРНК: она осуществляет гидролиз фосфодиэфирной связи, высвобождая 5'-фосфат зрелой тРНК и 3'-гидроксил лидерной последовательности. В клетках бактерий РНКаза Р участвует в разрезании предшественников еще нескольких РНК, в том числе, она вовлечена в образование 4.5S рРНК [50]. Возможно, хотя до сих пор прямо не показано, что эукариотическая РНКаза Р также имеет дополнительные субстра-

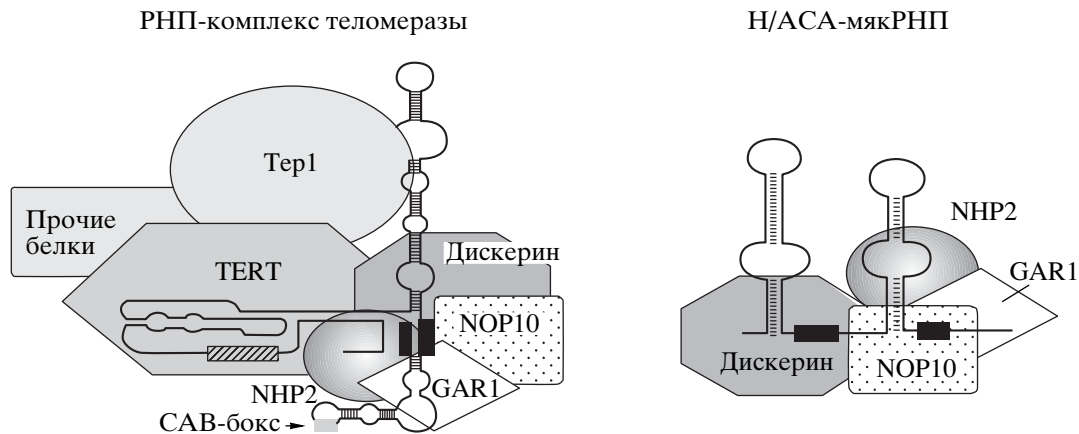


Рис. 5. Строение РНП-комплекса теломеразы. В теломеразной РНК домен, расположенный справа (вертикально), содержит боксы H, АСА (черные прямоугольники), обладает вторичной структурой, характерной для H/АСА-мякРНК, и связан с коровыми белками H/АСА-мякРНП. Последовательность, служащая матрицей для синтеза теломер, заштрихована. Для сравнения приведено строение H/АСА-мякРНП. По [46] с изменениями.

ты. В частности, ядерная форма РНКазы Р, помимо процессинга пре-тРНК, по-видимому, разрезает пре-рРНК во втором внутреннем транскрибируемом спейсере: в клетках дрожжей, содержащих мутантную РНКазу Р, накапливается 5.8S рРНК, удлиненная с 3'-конца [51].

РНК РНКазы Р содержит несколько участков, консервативных у представителей всех таксонов. Вторичная структура коровой части этой РНК также консервативна, тогда как в структуре периферийных участков наблюдается немалая вариабельность. У эукариот РНК, входящая в состав РНКазы Р, транскрибируется РНК-полимеразой III. Процессинг, видимо, происходит уже после сборки РНКазы Р, причем его детали отличаются у разных таксонов. Например, только у дрожжей удаляются 5'- и 3'-концевые области первичного транскрипта, в результате чего его длина уменьшается с 486 до 369 н. Сборка РНКазы Р происходит, очевидно, в ядрышке: предшественник и зрелая форма дрожжевой РНКазы Р локализованы в плотном фибриллярном компоненте, где осуществляется сборка. Позже РНКазы Р выявляется в составе мелких гранул в нуклеоплазме, где и происходит процессинг пре-тРНК с ее участием [50, 52]. Следует отметить, что некоторые пре-тРНК, как и РНКазы Р, первоначально находятся в ядрышке, поэтому вполне возможно, что процессинг пре-тРНК с участием РНКазы Р начинается в ядрышке. Кроме того, предполагается, что в ядрышке РНКазы Р участвует и в процессинге рРНК [50].

Наиболее просто устроена РНКазы Р бактерий: помимо собственно РНК длиной 350–400 н. в ее состав входит только один небольшой белок (119 аминокислот), причем РНК может выполнять каталитические функции. У эукариот, напротив, РНКазы Р представляет собой достаточно сложный РНП-комплекс, в состав которого вхо-

дят около 10 белков, а РНК сама по себе не проявляет каталитическую активность. Пока не ясно, связано ли последнее обстоятельство с тем, что присутствие белков обеспечивает правильную укладку РНК или с тем, что каталитические функции выполняет не РНК, а белки. У архей наблюдается промежуточная ситуация – РНК обладает некоторой каталитической активностью. РНКазы Р архей тоже состоит из нескольких белковых субъединиц, хотя их меньше, чем у эукариот. Все они гомологичны соответствующим субъединицам эукариот. Интересно, что ни одна из белковых субъединиц РНКазы Р эукариот и архей не имеет гомологии с белком РНКазы Р бактерий. Таким образом, для построения функционально идентичного фермента эукариоты и архей, с одной стороны, и бактерии, с другой, использовали однотипную РНК, но принципиально различные белковые компоненты [50].

Показано, что все субъединицы РНКазы Р необходимы для жизни дрожжевой клетки [50]. В связи с этим удивительным выглядит разнообразие субъединичного состава, наблюдаемое в разных таксонах. Так, нередко отсутствует одна или несколько субъединиц, входящих в состав РНКазы Р человека и дрожжей. Разнообразие субъединичного состава РНКазы Р обнаружено и у архей: РНКазы Р у разных видов нередко состоит не из четырех, а из двух или даже только из одной субъединицы. Пока это наблюдение не получило удовлетворительного объяснения [53]. Интересно, что единственная найденная у всех исследованных архей субъединица РНКазы Р кодируется, как и у бактерий, геном в составе оперона, содержащего гены рибосомных белков. Видимо, синтез РНКазы Р и рибосом необходимо координировать, что служит еще одним указанием на участие РНКазы Р в биогенезе рибосом [53].

Митохондриальная форма РНКазы Р, как и ядерная, разрезает предшественник тРНК. Она обнаружена у всех эукариот, однако лучше всего изучена у дрожжей. РНК дрожжевой митохондриальной РНКазы Р кодируется митохондриальным геномом и имеет сходство с бактериальной РНК РНКазы Р. Единственная, как и у бактерий, белковая субъединица РНКазы Р кодируется ядерным геномом, причем эта белковая субъединица не имеет сходства с бактериальной субъединицей. Более того, ни в геноме митохондрий, ни в геноме хлоропластов не обнаружено гомолога белка бактериальной РНКазы Р [50].

РНКазы Р хлоропластов изучена недостаточно. Возможно, эта форма РНКазы Р вообще не содержит РНК, хотя в геноме хлоропластов обнаружены нуклеотидные последовательности, гомологичные РНК РНКазы Р [50].

Таким образом, РНКазы Р присутствует у всех организмов, имеющих клеточное строение. Из всех РНП-частиц также широко распространены только рибосомы и сигнал-узнающие частицы (англ. *signal recognition particle*, SRP). Возникает вопрос, ответ на который пока неизвестен: почему для катализа столь простой реакции (разрыв одной фосфодиэфирной связи), которую вполне может осуществлять белок, понадобилась такая сложная и универсальная машина [53].

РНКазы MRP

В клетках эукариот, в отличие от бактерий и архей, присутствует еще одна РНП-эндонуклеаза, похожая на РНКазу Р – **РНКазы MRP**. Она локализована, главным образом, в ядрышке, хотя найдена и в митохондриях, где в ходе репликации ДНК разрушает связь между РНК-затравкой и вновь синтезированной ДНК, с чем и связано ее название (MRP – англ. *mitochondrial RNA processing*) [54]. В ядрышке РНКазы MRP разрезает пре-рРНК в сайте А3 первого внутреннего транскрибируемого спейсера, высвобождая зрелую 5.8S рРНК [50]. Хотя дрожжевая клетка может выжить и без зрелой 5.8S рРНК, все компоненты РНКазы MRP необходимы для жизни дрожжей. Эта РНКазы, очевидно, выполняет в клетке еще какую-то важную, но пока не установленную функцию. Возможно, РНКазы MRP участвует в контроле клеточного цикла, в частности, митоза [51].

РНК РНКазы MRP транскрибируется РНК-полимеразой III в нуклеоплазме. Центральный участок РНК MRP важен для ее импорта в митохондрии, а 5'-концевая область необходима для локализации в ядрышке [51]. Помимо РНК, в состав РНКазы MRP входит ряд белков, многие из которых присутствуют и в РНКазе Р. Например, у РНКазы Р и MRP дрожжей восемь из девяти белков общие [50]. Нуклеотидные последовательности

РНК РНКазы Р и MRP не консервативны, однако эти РНК имеют сходную вторичную структуру.

Таким образом, эукариоты, в отличие от других таксонов, имеют две похожие РНП-эндонуклеазы. Однако, несмотря на существенное структурное сходство, функции этих ферментов различны.

НОМЕНКЛАТУРА мякРНК

На сегодняшний день не существует единой номенклатуры мякРНК. Отчасти это связано с тем, что гомологи, обнаруженные у представителей разных крупных таксонов, например, у человека и дрожжей, сохраняют значимое сходство только в пределах характеристических последовательностей и антисмысловых элементов, так что называть их гомологами можно только условно.

мякРНК дрожжей первоначально называли по их положению при двумерном электрофорезе в полиакриламидном геле – snR1, snR2 ... или по количеству нуклеотидов в мякРНК: snR128, snR190 и т.д. [1]. От последней системы отказались, а первую используют до сих пор.

Названия большей части мякРНК позвоночных даны с использованием номенклатуры, созданной для мякРНК: за буквой "U" следует порядковый номер. Такая форма была выбрана из-за большого числа остатков урацила в мякРНК. И, хотя мякРНК далеко не всегда обогащены остатками U, для обозначения вновь открытых РНК, как правило (далеко не всегда), используют именно эту удобную и традиционную систему [1]. Гомологам, найденным у других организмов, присваивают то же имя, а перед названием мякРНК из крупных таксонов ставят две буквы, обозначающие организм, в котором найден гомолог. Например, обнаруженный у арабидопсиса гомолог мякРНК U29 позвоночных назван AtU29. Впрочем, нередко гомологам присваивают новые имена. Поскольку число организмов, у которых описывают гомологи известных мякРНК и новые мякРНК, неуклонно растет, у исследователей появляется возможность создавать собственные номенклатуры, и они активно ее используют. Поэтому названия мякРНК чрезвычайно разнообразны.

В начале 2006 г. Международным комитетом по номенклатуре генов (HUGO Gene Nomenclature Committee) было предложено ввести единую номенклатуру для мякРНК человека. В соответствии с ней названия мякРНК C/D-семейства будут иметь вид SNORDn, где n – номер мякРНК. Если есть возможность, то прежний номер мякРНК сохраняется. Например, мякРНК U87 [55] предложено называть SNORD87. Соответственно мякРНК семейства H/ACA получают названия SNORAn, а макРНК – SCARNAn. Если подобные системы будут введены и для других так-

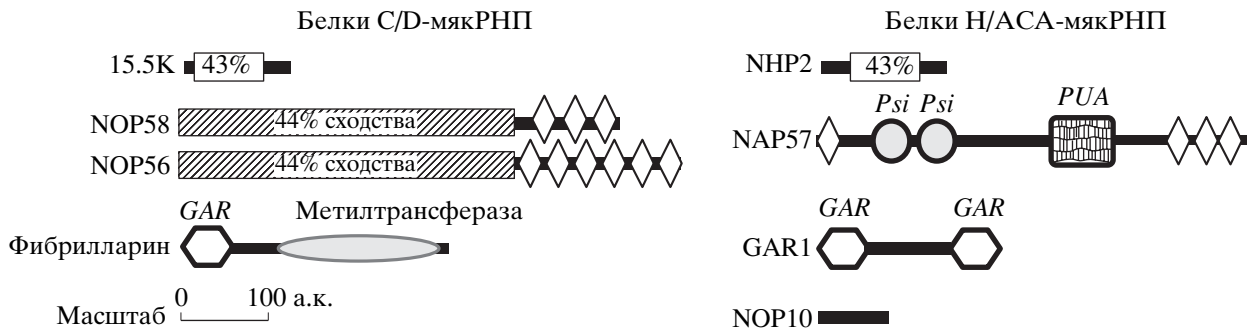


Рис. 6. Схема аминокислотных последовательностей белков C/D- и H/ACA-мякРНК человека. Приведены величины попарного сходства последовательностей белков NOP56 и NOP58, а также NHP2 и белка 15.5 кДа. %. Участки, обогащенные лизином, отмечены ромбиками; овалом обозначен домен, характерный для метилтрансфераз. Глицин-аргинин-богатые домены (GAR) показаны шестиугольниками; два сериновых кластера (Psi) – мотивы, присутствующие в большинстве псевдоуридинсинтаз, – обозначены кружками; прямоугольником отмечен домен, общий у псевдоуридинсинтаз и некоторых трансгликозилаз (PUA). Масштаб, в котором приведены последовательности всех белков, указан под последовательностью дискерина (NAP57). По [44] с изменениями.

сонов, то номенклатура мякРНК наконец обретет недостающую ясность.

ФОРМИРОВАНИЕ РНП

мякРНК *in vivo* всегда обнаруживаются в комплексе с белками, они образуют так называемые малые ядрышковые рибонуклеопротеидные частицы (мякРНП, англ. snoRNP – small nucleolar RNP). Часть мякРНП ассоциирована с созревающими рРНК (коэффициент седиментации комплекса – 70–90 S), а часть находится в свободном виде (10–15 S) [1].

Белки C/D-мякРНП

Зрелые C/D-мякРНК образуют стабильный комплекс с четырьмя консервативными белками, каждый из которых необходим для роста дрожжей [56] (здесь и далее через косую приведены названия белка позвоночных и дрожжей): 15.5 кДа/Snu13p, NOP56/Nop56p, NOP58/Nop58p и с фибрилларином/Nop1p (рис. 1б).

Все эти белки связываются с C/D-мотивом, стабилизируя мякРНК и предохраняя их концы от действия экзонуклеаз [57]. Эти белки необходимы также для ядрышковой локализации C/D-мякРНП, хотя эффекты, наблюдаемые в отсутствие каждого из них, несколько различаются: у дрожжей удаление белков Nop1p или Snu13p нарушает ядрышковую локализацию мякРНК сильнее, чем удаление Nop56p или Nop58p [35].

Белок **15.5 кДа/Snu13p** относится к семейству РНК-связывающих белков, в состав которого входят также несколько рибосомных белков и белок NHP2, ассоциированный с H/ACA-мякРНП. Помимо C/D-мякРНП, Snu13p обнаружен в сплайсосомном комплексе, образованном мяРНП U4/U6-U5,

где, как и в комплексе с C/D-мякРНК, он связывается с мотивом K-turn мяРНК U4 [11, 58].

Два других белка C/D мякРНП, **NOP56/Nop56p** и **NOP58/Nop58p**, являются гомологами [59] (рис. 6) и обладают сходством с белком 61 кДа/Prp31p, компонентом комплекса U4/U6-U5 мяРНП [58].

В настоящее время неясно, имеет ли структурное сходство C/D-мякРНП и мяРНП функциональное значение. Возможно, что после сплайсинга мРНК гена-хозяина Snu13p перемещается из сплайсосомы в формирующийся комплекс мякРНП. В связи с этим интересно отметить, что расстояние от конца гена мякРНК до точки ветвления критично для образования мякРНК [60].

Реакцию метилирования осуществляет, очевидно, **фибрилларин/Nop1p**, хотя прямых подтверждений этого ни у животных, ни у дрожжей не получено [56]. Фибрилларин содержит домен, связывающий S-аденозилметионин, донор метильных групп. Кроме того, на уровне аминокислотной последовательности и третичной структуры фибрилларин сходен с известными метилтрансферазами. Наконец, метилтрансферазная активность, обнаруженная у гомолога фибрилларина из архей, служит убедительным доводом в пользу существования этой активности у фибрилларина эукариот [61].

Сборка C/D-мякРНП

Сборка C/D-мякРНП может начаться после того, как в ходе сворачивания предшественника мякРНК образуется C/D-мотив. Затем с C/D-мотивом связывается белок 15.5 кДа/Snu13p, который, видимо, взаимодействует непосредственно с петлей K-turn-мотива [58]. Для связывания этого белка необходима целостность обоих двухцепочечных участков C/D-мотива, а их нуклеотидная последовательность не важна [62]. Вероятно, свя-

зывание белка 15.5 кДа/Snu13p вызывает конформационные изменения мякРНК, так что она становится способной связывать остальные белки мякРНК [62]. Таким образом, сборка C/D-мякРНК является иерархическим процессом, протекающим в несколько этапов.

Связывание белка 15.5 кДа с мякРНК позвончных, кодируемых интронами, происходит во время сплайсинга, а именно, на так называемой стадии комплекса C1, когда с пре-мРНК связаны только U2, U5 и U6 мяРНК. Вероятно, белки сплайсосомы рекрутируют белок 15.5 кДа или убирают какие-то факторы, препятствующие его связыванию. Связывание белка 15.5 кДа и последующая сборка мякРНК происходят только тогда, когда ген мякРНК находится на оптимальном расстоянии (около 70 н.) от точки ветвления. Вероятно, это обусловлено тем, что, когда ген расположен слишком близко (50 н. и меньше) от точки ветвления, белки мякРНК конкурируют за сайты связывания с белками сплайсосомы, а при слишком большом расстоянии (200 н. и больше) сплайсосома, по-видимому, уже не может рекрутировать белок 15.5 кДа [63].

Интересно, что некоторые мякРНК находятся очень далеко (около 300 н.) от точки ветвления, но несмотря на это их процессинг проходит нормально [60]. Оказалось, что нуклеотидные последовательности, фланкирующие гены всех этих РНК, способны образовывать особенно длинные двухцепочечные участки (12 п.н. и более). С предшественником мякРНК, стабилизированным такой структурой, белок 15.5 кДа и, очевидно, прочие коровые белки C/D-РНК могут связываться даже в отсутствие сплайсинга, хотя мякРНК, естественно, не образуется. Таким образом, протяженный двухцепочечный участок, образуемый предшественником мякРНК, компенсирует неоптимальное положение мякРНК в интроне [63].

Для связывания остальных трех белков C/D-мякРНК с мякРНК абсолютно необходима не только целостность двухцепочечных участков C/D-мотива, но и нуклеотидная последовательность спирали 2, включающей в себя боксы С и D (рис. 2б). Любые изменения этой последовательности, даже сохраняющие комплементарные взаимодействия, приводят к практически полной потере способности этих белков мякРНК связываться с мякРНК. Таким образом, боксы С и D, формирующие спираль 2, необходимы для связывания остальных коровых белков мякРНК.

Детали процесса ассоциации этих белков с мякРНК все еще до конца не ясны, однако известно, что фибрилларин связывается с боксом D, а NOP58 – с боксом С, причем их связывание происходит независимо друг от друга [64]. Ассоциация фибрилларина с боксом D согласуется с его предполагаемой метилтрансферазной активно-

стью, поскольку положение сайта метилирования определяется расстоянием именно от бокса D. Связывание NOP56, который, как показано, не необходим для стабильности мякРНК, происходит только после связывания фибрилларина [65], причем непосредственного взаимодействия NOP56 с C/D-мотивом не обнаружено [64]. Очевидно, NOP56 связывается с C/D-мотивом за счет белок-белковых взаимодействий (рис. 1б).

Следует отметить, что C/D-мякРНК содержат не только боксы С и D, но и боксы С' и D', расположенные в центральной части молекулы и часто сближенные в результате образования шпильки. В связи с этим разумным выглядело бы предположение о том, что C/D-мякРНК содержат две копии C/D-мотива и связывают два набора белков, обладая, таким образом, модульной структурой. Это предположение поддерживалось тем, что многие мякРНК обладают двумя антисмысловыми элементами или только одним, но расположенным вблизи бокса D'. Следовательно, предполагаемый C'/D'-мотив должен направлять реакцию метилирования, что и было показано [13]. Однако C'/D'-мотив значительно менее консервативен, чем C/D-мотив: боксы С', D' и фланкирующие их последовательности обычно вырождены и не способны формировать K-turn-мотив, необходимый для связывания белка 15.5 кДа/Snu13p и последующего формирования РНК. Действительно, показано, что белок 15.5 кДа взаимодействует только с C/D-мотивом, но не с C'/D'-мотивом [66]. Не обнаружено и связывания с C'/D'-мотивом белка NOP58 [64]. Только NOP56 и фибрилларин способны связываться с C'/D'-мотивом: NOP56 – с элементом С', а фибрилларин – с С' и D' [64]. Таким образом, C/D-мякРНК имеют асимметричную структуру (рис. 1б).

Интересно, что даже когда внутренние участки мякРНК способны формировать полноценный C'/D'-мотив, белок 15.5 кДа все равно не может связаться с ним [66]. Возможно, это обусловлено тем, что фибрилларин и NOP56 взаимодействуют, в том числе, с теми же нуклеотидами C'/D'-мотива, что и 15.5 кДа белок и таким образом перекрывают доступ белку 15.5 кДа к участку связывания [15]. Поскольку непосредственно в метилировании участвует только фибрилларин, для осуществления модификации, возможно, не требуется стабильного связывания всех коровых белков с C'/D'-мотивом. Фибрилларин же связан и с C/D-, и с C'/D'-мотивами, так что C/D-мякРНК скорее всего содержат две молекулы фибрилларина [64].

Таким образом, к C/D- и C'/D'-мотивам предъявляются, очевидно, разные требования: C'/D'-мотив должен только направлять метилирование, тогда как C/D-мотив обеспечивает еще и стабильность и ядрышковую локализацию мякРНК. Ве-

роятно, такое распределение функций обуславливает асимметричное строение С/D-мякРНП.

Эта ситуация удивительным образом контрастирует с наблюдаемой в археях, где и с С/D-, и с С'/D'-мотивами связываются полные наборы белков С/D-мякРНП. Следует отметить, что у архей боксы С' и D' почти никогда не бывают вырощенными [15].

Белки Н/АСА мякРНП

Как и С/D-мякРНК, зрелые Н/АСА-мякРНК ассоциированы с четырьмя консервативными белками [67, 68]: GAR1/Gar1p, дискерином (dyskerin)/Cbf5p, NHP2/Nhp2p и NOP10/Nop10p (рис. 3а). Все они прямо взаимодействуют с мякРНК [69], необходимы для роста дрожжей и, за исключением GAR1/Gar1p, для стабильности мякРНК [44].

Центральный домен **GAR1/Gar1p** прямо связывает мякРНК, а концевые домены, содержащие Gly/Arg-повторы, благодаря которым белок получил свое название [70], стабилизируют связывание мякРНК с пре-рРНК и вовлечены в белок-белковые взаимодействия [71]. Удаление GAR1 подавляет псевдоуридилрование [72], однако не влияет на накопление мякРНП.

Дискерин (NAP57)/Cbf5p является, очевидно, псевдоуридинсинтазой, хотя, как и в случае с фибриларином, прямо это не показано. Дискерин содержит два мотива, найденных в большинстве псевдоуридинсинтаз (рис. 6), и имеет на протяженном участке 34%-ную гомологию с псевдоуридинсинтазой TruV *E. coli* [44]. Кроме того, точечные мутации в этом белке резко снижают уровень псевдоуридилрования рРНК (нокаут гена у дрозофил и мышей приводит к гибели эмбрионов). Мутации в гене дискерина могут приводить к развитию врожденного дискератоза (dyskeratosis congenita) – наследственной болезни, сопровождающейся пойкилодермией (дистрофическим изменением кожи), дистрофией ногтей и рядом других симптомов [46].

Роль еще двух небольших основных коровых белков – **NHP2/Nhp2p** и **NOP10/Nop10p** – до сих пор не вполне ясна, хотя они необходимы для функционирования Н/АСА-мякРНП. Белок NHP2 впервые был выделен как связанный с хроматином негистоновый белок [44]. Он является гомологом белка 15.5 кДа С/D-мякРНП, а также рибосомного белка L30. Аминокислотная последовательность белка NOP10 [68], как и других коровых белков мякРНП, консервативна у представителей разных таксонов, однако NOP10 не содержит каких-либо известных мотивов и не имеет гомологов среди коровых белков мякРНП.

Интересно, что в состав С/D- и Н/АСА-мякРНП входят гомологичные белки и белки с одинаковыми доменами (рис. 6).

Общие домены имеют псевдоуридинсинтаза дискерин (NAP57) и белки С/D-РНП NOP56 и NOP58, а также метилтрансфераза фибрилларин и GAR1. Наиболее интересным представляется сходство белка NHP2 с белком 15.5 кДа С/D-мякРНП, который связывается с K-turn-мотивом. Ортологом этих белков в археях является рибосомный белок L7Ae, который входит в состав коровых белков С/D- и Н/АСА-мякРНП [44]. Предположение о том, что Н/АСА-мякРНК содержит K-turn-мотив, ожидает своей проверки.

Сборка Н/АСА-мякРНП

В отличие от С/D-мякРНП, сборка которых проходит в несколько этапов, белки Н/АСА-мякРНП могут взаимодействовать друг с другом в отсутствие РНК [73]: GAR1 и NOP10 способны связывать дискерин независимо друг от друга, а для связывания NHP2 дискерин должен предварительно образовать комплекс с NOP10. Для связывания Н/АСА-РНК и у позвоночных, и у дрожжей достаточно тримера дискерин/NOP10/NHP2 [44]. Белки Н/АСА-мякРНП взаимодействуют с предшественником мякРНК не во время сплайсинга, как в случае С/D-мякРНК, а на более ранней стадии, одновременно с выбором сайтов сплайсинга. Таким образом, процессинг Н/АСА-РНК не зависит от сплайсинга, и поэтому у генов этих РНК, в отличие от генов С/D-РНК, отсутствует предпочтительная локализация вблизи 3'-сайта сплайсинга [74]. На электронных микрофотографиях очищенных дрожжевых Н/АСА-мякРНП видно, что каждая Н/АСА-РНК ассоциирована с двумя наборами белков – с каждой шпилькой связано, очевидно, по четыре коровых белка [67].

Белки, участвующие в биогенезе С/D- и Н/АСА-мякРНП

Сборка мякРНП происходит котранскрипционно [75]. И в сборку, и в транспорт мякРНП вовлечены вспомогательные белки, которые не связаны со зрелыми мякРНП и не нужны для их функционирования. Пока известно менее 10 таких белков [44], наиболее изученные из них описаны ниже.

С мякРНК С/D-семейства слабо ассоциированы два структурно родственных нуклеоплазматических белка: **TP48** (известный также как TP49b, RUVBL2, p50, TAP54β и Reptin42) и **TP49** (он же TP49a, RUVBL1, p55 и TAP54) [56]. Эти белки обладают ДНК-хеликазной активностью и участвуют во многих процессах, в частности, в репарации и транскрипции [76], в сборке и транспорте мякРНП. Например, дрожжевой ортолог TP48 необходим для накопления С/D- и Н/АСА-мякРНК и для ядрышковой локализации белков Nop1p и Gar1p – коровых компонентов мякРНП [56].

В ядрышке и ТК найден белок **Nopp140**, который курсирует между этими органеллами и между ядрышком и цитоплазмой. Он взаимодействует с C/D- и H/ACA-мякРНК и, видимо, участвует в их сборке и транспорте. Гомолог Nopp140, по крайней мере в дрожжах, необходим для накопления H/ACA-РНК и удержания C/D-РНК в ядрышке [56].

Белок **SMN** (*survival of motoneurons*), мутации в котором вызывают спинальную мышечную атрофию (*spinal muscular atrophy*), взаимодействует с коровыми белками C/D- и H/ACA-мякРНК, фибрилларином и GAR1, и, вероятно, участвует в сборке мякРНК. SMN является также одним из важнейших белков, необходимых для сборки РНК, которые участвуют в биогенезе рибосом, а также в сплайсинге и транскрипции [56]. Следует отметить, что столь важный для высших эукариот белок отсутствует в дрожжах, по крайней мере, его гомолог у них не обнаружен [44].

В отличие от мякРНК, направляющих модификации нуклеотидов, мякРНК, участвующие в процессинге рРНК, обычно ассоциированы с более многочисленным набором белков. Например, U3 РНК, участвующий в образовании 18S рРНК из предшественника, содержит не только четыре обычных коровых белка, но и еще один дополнительный, и некоторую часть времени связан еще, по меньшей мере, с семью другими белками [56].

В заключение можно отметить, что в настоящее время мякРНК, наряду с микроРНК, представляют собой две наиболее многочисленные и хорошо изученные группы малых некодирующих РНК. Тем не менее, функциональная значимость подавляющего числа модификаций, направляемых мякРНК, до сих пор неизвестна, несмотря на многочисленные попытки их выяснить (см., например, [77–82]). Полученные на сегодняшний день экспериментальные данные позволяют заключить, что модификации небольшого числа остатков рРНК, мякРНК и мРНК имеют выраженные фенотипические проявления [6, 83–85], в то время как эффект других модификаций проявляется достаточно ярко лишь при их кооперативном взаимодействии и выражается в стабилизации структуры РНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maxwell E.S., Fournier M.J. 1995. The small nucleolar RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 897–934.
2. Lapeyre B., Purushothaman S.K. 2004. Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol. Cell.* **16**, 663–669.
3. Bachellerie J.P., Cavaille J. 1997. Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 257–261.
4. Weinstein L.B., Steitz J.A. 1999. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Current Opin. Cell. Biol.* **11**, 378–384.
5. Ding F., Prints Y., Dhar M.S., Johnson D.K., Garnacho-Montero C., Nicholls R.D., Francke U. 2005. Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mammal. Genome.* **16**, 424–431.
6. Kishore S., Stamm S. 2006. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science.* **311**, 230–232.
7. Tollervey D., Kiss T. 1997. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Current Opin. Cell. Biol.* **9**, 337–342.
8. Gerbi S.A., Borovjagin A.V., Lange T.S. 2003. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opin. Cell. Biol.* **15**, 318–325.
9. Brown J.W., Echeverria M., Qu L.H. 2003. Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression. *Trends Plant Sci.* **8**, 42–49.
10. Samarsky D.A., Fournier M.J., Singer R.H., Bertrand E. 1998. The snoRNA box C/D motif directs nucleolar targeting and also couples snoRNA synthesis and localization. *EMBO J.* **17**, 3747–3757.
11. Klein D.J., Schmeing T.M., Moore P.B., Steitz T.A. 2001. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* **20**, 4214–4221.
12. Speckmann W.A., Terns R.M., Terns M.P. 2000. The box C/D motif directs snoRNA 5'-cap hypermethylation. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4467–4473.
13. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Kiss T. 1998. Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J.* **17**, 797–807.
14. Tollervey D. 1996. Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. *Science.* **273**, 1056–1057.
15. Henras A.K., Dez C., Henry Y. 2004. RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Current Opin. Struct. Biol.* **14**, 335–343.
16. Tycowski K.T., Aab A., Steitz J.A. 2004. Guide RNAs with 5' caps and novel box C/D snoRNA-like domains for modification of snRNAs in metazoa. *Current Biol.* **14**, 1985–1995.
17. Tycowski K.T., You Z.H., Graham P.J., Steitz J.A. 1998. Modification of U6 spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol. Cell.* **2**, 629–638.
18. Darzacq X., Jady B.E., Verheggen C., Kiss A.M., Bertrand E., Kiss T. 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J.* **21**, 2746–2756.
19. Cavaille J., Buiting K., Kiefmann M., Lalonde M., Brannan C.L., Horsthemke B., Bachellerie J.P., Brosius J., Huttenhofer A. 2000. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 14311–14316.
20. Runte M., Huttenhofer A., Gross S., Kiefmann M., Horsthemke B., Buiting K. 2001. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Human Mol. Genet.* **10**, 2687–2700.
21. Cavaille J., Seitz H., Paulsen M., Ferguson-Smith A.C., Bachellerie J.P. 2002. Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Human Mol. Genet.* **11**, 1527–1538.

22. Vitali P., Royo H., Seitz H., Bachellerie J. P., Huttenhofer A., Cavaille J. 2003. Identification of 13 novel human modification guide RNAs. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6543–6551.
23. Vitali P., Basyuk E., Le Meur E., Bertrand E., Muscatelli F., Cavaille J., Huttenhofer A. 2005. ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *J. Cell. Biol.* **169**, 745–753.
24. Omer A.D., Lowe T.M., Russell A.G., Ehardt H., Eddy S.R., Dennis P.P. 2000. Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science.* **288**, 517–522.
25. Starostina N.G., Marshburn S., Johnson L.S., Eddy S.R., Terns R.M., Terns M.P. 2004. Circular box C/D RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 14097–14101.
26. Mishra R.K., Eliceiri G.L. 1997. Three small nucleolar RNAs that are involved in ribosomal RNA precursor processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 4972–4977.
27. Atzorn V., Fragapane P., Kiss T. 2004. U17/snrR30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1769–1778.
28. Ganot P., Bortolin M.L., Kiss T. 1997. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell.* **89**, 799–809.
29. Bortolin M.L., Ganot P., Kiss T. 1999. Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs. *EMBO J.* **18**, 457–469.
30. Balakin A. G., Smith L., Fournier M.J. 1996. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell.* **86**, 823–834.
31. Narayanan A., Lukowiak A., Jady B.E., Dragon F., Kiss T., Terns R.M., Terns M.P. 1999. Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *EMBO J.* **18**, 5120–5130.
32. Kiss A.M., Jady B.E., Bertrand E., Kiss T. 2004. Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5797–5807.
33. Gall J.G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 273–300.
34. Carmo-Fonseca M. 2002. New clues to the function of the Cajal body. *EMBO Rep.* **3**, 726–727.
35. Verheggen C., Mouaikel J., Thiry M., Blanchard J.M., Tollervey D., Bordonne R., Lafontaine D.L., Bertrand E. 2001. Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J.* **20**, 5480–5490.
36. Raska I., Andrade L.E., Ochs R.L., Chan E.K., Chang C.M., Roos G., Tan E.M. 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell. Res.* **195**, 27–37.
37. Gall J.G., Bellini M., Wu Z., Murphy C. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 4385–4402.
38. Kiss A.M., Jady B.E., Darzacq X., Verheggen C., Bertrand E., Kiss T. 2002. A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4643–4649.
39. Jady B.E., Kiss T. 2001. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *EMBO J.* **20**, 541–551.
40. Richard P., Darzacq X., Bertrand E., Jady B.E., Verheggen C., Kiss T. 2003. A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs. *EMBO J.* **22**, 4283–4293.
41. Narayanan A., Speckmann W., Terns R., Terns M.P. 1999. Role of the box C/D motif in localization of small nucleolar RNAs to coiled bodies and nucleoli. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 2131–2147.
42. Shaw P.J., Beven A.F., Leader D.J., Brown J.W. 1998. Localization and processing from a polycistronic precursor of novel snoRNAs in maize. *J. Cell. Sci.* **111**, 2121–2128.
43. Mitchell J.R., Cheng J., Collins K. 1999. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 567–576.
44. Meier U.T. 2005. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma.* **114**, 1–14.
45. Lukowiak A.A., Narayanan A., Li Z.H., Terns R.M., Terns M.P. 2001. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA.* **7**, 1833–1844.
46. Mason P.J., Wilson D.B., Bessler M. 2005. Dyskeratosis congenita – a disease of dysfunctional telomere maintenance. *Current Mol. Med.* **5**, 159–170.
47. Jady B.E., Bertrand E., Kiss T. 2004. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J. Cell. Biol.* **164**, 647–652.
48. Zhu Y., Tomlinson R.L., Lukowiak A.A., Terns R.M., Terns M.P. 2004. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 81–90.
49. Etheridge K.T., Banik S.S., Armbruster B.N., Zhu Y., Terns R.M., Terns M.P., Counter C.M. 2002. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J. Biol. Chem.* **277**, 24764–24770.
50. Xiao S., Scott F., Fierke C.A., Engelke D.R. 2002. Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 165–189.
51. van Eenennaam H., Jarrous N., van Venrooij W.J., Pruijn G.J. 2000. Architecture and function of the human endonucleases RNase P and RNase MRP. *IUBMB Life.* **49**, 265–272.
52. Jarrous N. 2002. Human ribonuclease P: subunits, function, and intranuclear localization. *RNA.* **8**, 1–7.
53. Hartmann E., Hartmann R.K. 2003. The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends Genet.* **19**, 561–569.
54. Chang D.D., Clayton D.A. 1987. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science.* **235**, 1178–1184.
55. Gogolevskaya I.K., Makarova J.A., Gause L.N., Kulichkova V.A., Konstantinova I.M., Kramerov D.A. 2002. U87 RNA, a novel C/D box small nucleolar RNA from mammalian cells. *Gene.* **292**, 199–204.
56. Filipowicz W., Pogacic V. 2002. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Current Opin. Cell. Biol.* **14**, 319–327.
57. Kiss T. 2004. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J. Cell. Sci.* **117**, 5949–5951.

58. Watkins N.J., Segault V., Charpentier B., Nottrott S., Fabrizio P., Bachi A., Wilm M., Rosbash M., Branlant C., Luhrmann R. 2000. A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell*. **103**, 457–466.
59. Gautier T., Berges T., Tollervey D., Hurt E. 1997. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7088–7098.
60. Hirose T., Steitz J.A. 2001. Position within the host intron is critical for efficient processing of box C/D snoRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 12914–12919.
61. Omer A.D., Ziesche S., Ebhardt H., Dennis P.P. 2002. In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 5289–5294.
62. Watkins N.J., Dickmanns A., Luhrmann R. 2002. Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8342–8352.
63. Hirose T., Shu M.D., Steitz J.A. 2003. Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells. *Mol. Cell*. **12**, 113–123.
64. Cahill N.M., Friend K., Speckmann W., Li Z.H., Terns R.M., Terns M.P., Steitz J.A. 2002. Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP. *EMBO J.* **21**, 3816–3828.
65. Lafontaine D.L., Tollervey D. 2000. Synthesis and assembly of the box C + D small nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2650–2659.
66. Szewczak L.B., DeGregorio S.J., Strobel S.A., Steitz J.A. 2002. Exclusive interaction of the 15.5 kD protein with the terminal box C/D motif of a methylation guide snoRNP. *Chem. Biol.* **9**, 1095–1107.
67. Watkins N.J., Gottschalk A., Neubauer G., Kastner B., Fabrizio P., Mann M., Luhrmann R. 1998. Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA*. **4**, 1549–1568.
68. Henras A., Henry Y., Bousquet-Antonelli C., Noaillac-Depeyre J., Gelugne J.P., Caizergues-Ferrer M. 1998. Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* **17**, 7078–7090.
69. Dragon F., Pogacic V., Filipowicz W. 2000. In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3037–3048.
70. Girard J.P., Lehtonen H., Caizergues-Ferrer M., Amalric F., Tollervey D., Lapeyre B. 1992. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* **11**, 673–682.
71. Lafontaine D.L., Tollervey D. 1998. Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 383–388.
72. Bousquet-Antonelli C., Henry Y., G'Elugne J.P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. 1997. A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *EMBO J.* **16**, 4770–4776.
73. Henras A.K., Caeyrou R., Henry Y., Caizergues-Ferrer M. 2004. Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with Gar1p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs. *RNA*. **10**, 1704–1712.
74. Richard P., Kiss A.M., Darzacq X., Kiss T. 2006. Cotranscriptional recognition of human intronic box H/ACA snoRNAs occurs in a splicing-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2540–2549.
75. Ballarino M., Morlando M., Pagano F., Fatica A., Bozzoni I. 2005. The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5396–5403.
76. Newman D.R., Kuhn J.F., Shanab G.M., Maxwell E.S. 2000. Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription. *RNA*. **6**, 861–879.
77. Samarsky D.A., Balakin A.G., Fournier M.J. 1995. Characterization of three new snRNAs from *Saccharomyces cerevisiae*: snR34, snR35 and snR36. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2548–2554.
78. Parker R., Simmons T., Shuster E.O., Siliciano P.G., Guthrie C. 1988. Genetic analysis of small nuclear RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*: viable sextuple mutant. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3150–3159.
79. Lowe T.M., Eddy S.R. 1999. A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science*. **283**, 1168–1171.
80. Qu L.H., Henras A., Lu Y.J., Zhou H., Zhou W.X., Zhu Y.Q., Zhao J., Henry Y., Caizergues-Ferrer M., Bachellerie J.P. 1999. Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1144–1158.
81. Samarsky D.A., Fournier M.J. 1999. A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **27**, 161–164.
82. Li S.G., Zhou H., Luo Y.P., Zhang P., Qu L.H. 2005. Identification and functional analysis of 20 Box H/ACA small nucleolar RNAs (snoRNAs) from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **280**, 16446–16455.
83. King T.H., Liu B., McCully R.R., Fournier M.J. 2003. Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol. Cell.* **11**, 425–435.
84. Widerak M., Kern R., Malki A., Richarme G. 2005. U2552 methylation at the ribosomal A-site is a negative modulator of translational accuracy. *Gene*. **347**, 109–114.
85. Newby M.I., Greenbaum N.L. 2001. A conserved pseudouridine modification in eukaryotic U2 snRNA induces a change in branch-site architecture. *RNA*. **7**, 833–845.